

## **GRADO EN BIOTECNOLOGÍA**

### **TRABAJO FIN DE GRADO**

**Revisión: Impacto de la aplicación de técnicas “ómicas” en microalgas en el desarrollo de nuevas aplicaciones biotecnológicas. Análisis de las potenciales aplicaciones de *Nannochloropsis gaditana*.**

---

**MARÍA BERMÚDEZ SAÚCO**

Tutores:

Francisco Javier Fernández Acero

Rafael Carrasco Reinado

## Índice de contenidos

---

|   |    |
|---|----|
| 1. Propuesta del TFG asignada.....                        | 3  |
| 2. Resumen .....  | 4  |
| 3. Summary.....   | 5  |
| 4. Introducción .....                                     | 6  |
| 4.1. Definición y características de las microalgas ..... | 6  |
| 4.2. Interés industrial sobre las microalgas.....         | 7  |
| 4.3. <i>Nannochloropsis gaditana</i> .....                | 12 |
| 5. Objetivos.....   | 14 |
| 6. Contenido.....   | 15 |
| 6.1. Estudio de las condiciones de cultivo .....          | 15 |
| 6.2. Acuicultura .....                                    | 20 |
| 6.3. Tratamiento de aguas .....                           | 22 |
| 6.4. Biomedicina y farmacología .....                     | 24 |
| 6.5. Alimentación humana y pienso animal .....            | 26 |
| 6.6. Industria cosmética.....                             | 28 |
| 6.7. Industria energética.....                            | 29 |
| 6.8. Ómicas e ingeniería genética.....                    | 29 |
| 7. Conclusiones.....                                      | 34 |
| 8. Perspectivas de futuro .....                           | 35 |
| 9. Bibliografía.....                                      | 36 |
| 10. Apéndices.....  | 48 |

## 1. Propuesta del TFG asignada

---

Los organismos no modelo se han revelado como una fuente de nuevos bioproductos para la salud humana, industria, aplicaciones agrícolas y biotecnológicas. El rápido desarrollo de las tecnologías “ómicas” ha permitido el estudio directo de microorganismos no modelo para el descubrimiento de nuevos metabolitos especializados. Entre estos microorganismos no modelo, las microalgas han despertado un gran interés como fuente de una gran cantidad de estos nuevos bioproductos. Dentro de este amplio grupo destaca *Nannochloropsis gaditana* por su gran versatilidad, facilidad de cultivo y prestaciones agroalimentarias.

Estos organismos fotosintéticos han demostrado ser capaces de producir un sinnúmero de compuestos de interés industrial, en todos los sectores, desde el energético hasta en la biomedicina. Las microalgas tienen la capacidad para solucionar algunos de los grandes problemas que está enfrentando la humanidad, como el calentamiento global o el desarrollo de nuevos tratamientos para enfermedades que afectan a la población mundial. En esta revisión se condensarán los avances en las distintas técnicas moleculares y “ómicas” aplicadas en microalgas, así como, sus aplicaciones biotecnológicas y las perspectivas futuras de desarrollo.

## 2. Resumen

---

Los ecosistemas marinos son los más desconocidos del planeta. Mediante el uso de la biotecnología y las técnicas “-ómicas”, se podrán ir descubriendo las oportunidades que ofrecen. Dentro de estos ecosistemas, se encuentran las microalgas como base de los mismos (producción primaria). Con millones de especies estimadas, estos microorganismos suponen una fuente “infinita” de biocomponentes activos que ofrecen multitud de aplicaciones al mundo de la biotecnología en muy diversas áreas. Actualmente, se estima que las microalgas pueden proporcionar soluciones a grandes problemas que afronta la humanidad: el hambre, al ser considerados súper alimentos; ayudar a la mitigación del efecto invernadero, o incluso encontrar soluciones a enfermedades actuales y futuras.

En el presente Trabajo Final de Grado se desarrollan cada una de las aplicaciones más relevantes, haciendo hincapié en los últimos hallazgos y en las posibles opciones futuras que se contemplan en cada una de ellas: acuicultura, tratamiento de aguas residuales, alimentación humana y pienso animal, biomedicina, industria cosmética y energética. De la misma forma, se trata la optimización de los parámetros necesarios para el cultivo de las microalgas, que varían dependiendo de la especie utilizada.

Asimismo, se revisan las técnicas “-ómicas” como una de las herramientas biotecnológicas más importantes y con mayor desarrollo hoy en día, ya que estas nos permiten obtener una enorme cantidad de datos en muy poco tiempo. En concreto, se incide en la proteómica como técnica capaz de generar, en un solo análisis proteómico de una especie, gran cantidad de información de interés. Se introduce, además, el concepto de proteómica aplicada, en el que a partir de los datos generados por el estudio de un proteoma, se puede obtener una información de alto valor industrial, identificando proteínas con aplicaciones directas en diferentes sectores.

Esta revisión se centra especialmente en la microalga *Nannochloropsis gaditana*, debido a que es una de las especies más utilizadas a nivel industrial. Además de destacar por su alto contenido en ácidos grasos poliinsaturados (PUFAs) y conformar un recurso muy útil para la acuicultura, esta especie cuenta con posibles aplicaciones en muchos de los campos mencionados. Es gracias a la facilidad para cultivarla y a su alto contenido proteico, que esta microalga se ha convertido en uno de los potenciales biotecnológicos que posee la Bahía de Cádiz.

### 3. Summary

---

Marine ecosystems are the least known on the planet. Through the use of biotechnology and "-omic" techniques, the opportunities they offer can be discovered. Within these ecosystems, microalgae act as a base (primary production). With millions of species estimated, these microorganisms represent an "infinite" source of active biocomponents that offer the world of biotechnology a multitude of applications in a wide range of areas. Today, it is estimated that microalgae can provide solutions to major problems facing humanity: hunger, as they are considered super food; help mitigate the greenhouse effect; or even find solutions to current and future diseases.

This Final Degree Project develops each of the most relevant applications, emphasizing the latest findings and possible future options that are considered in each of them: aquaculture, wastewater treatment, human food and animal feed, biomedicine and cosmetics and energy industry. In the same way, the optimisation of the necessary parameters for the cultivation of microalgae, which vary depending on the species used is dealt with.

Likewise, the "-omic" techniques are reviewed as one of the most important biotechnological tools and with greater development nowadays, since they allow us to obtain a great amount of data in a very short time. Specifically, we focus on proteomics as a technique capable of generating a large amount of interesting information in a single proteomic analysis of one species. The concept of applied proteomics is also introduced, in which, from the data generated by the study of a proteome, information of high industrial value can be obtained, identifying proteins with direct applications in different sectors.

This review focuses particularly on the microalgae *Nannochloropsis gaditana*, because it is one of the most widely used species at industrial level. In addition to being notable for its high content of polyunsaturated fatty acids (PUFAs) and forming a very useful resource for aquaculture, this species has possible applications in many of the fields mentioned. It is thanks to the ease with which it can be cultivated and its high protein content that this microalgae has become one of the biotechnological potentials of the Bay of Cadiz.

## 4. Introducción

---

Recientemente, las microalgas han obtenido un rol muy importante en el área de la biotecnología. Actualmente, debido a su diversidad y potencialidad, las microalgas son unos de los microorganismos más estudiados, ya que su interés ha ido aumentando considerablemente año tras año [1–5]. Durante los últimos años, las microalgas han ido adquiriendo un mayor protagonismo en la biotecnología. Se conoce que aproximadamente el 70% del planeta está cubierto por agua, por lo que los microorganismos acuáticos no modelo llevan siendo años objeto de estudio [6]. El interés sobre las microalgas surge como una alternativa a los combustibles fósiles, ya que pueden disminuir el impacto del CO<sub>2</sub> emitido en su quema, ayudando a controlar el efecto invernadero, además de poder ser utilizadas como alimento, pienso para animales, fertilizantes, y necesitar menos extensión para sus cultivos protegiendo a los ecosistemas [1]. En las últimas décadas han surgido multitud de plantas industriales para producir microalgas y generar biomasa a partir de diversas especies que han ido cobrando interés en la industria e investigación por su flexibilidad metabólica, características fisiológicas, y en definitiva, por sus usos directos o potenciales como fuente de nuevos productos [6]. El creciente interés sobre estos microorganismos se debe a las ventajas que potencialmente pueden proporcionar a las personas, tanto a nivel global (efecto invernadero) como a nivel individual (biomedicina).

El desarrollo de la biotecnología ha permitido el cultivo y la explotación industrial de las microalgas. Es el caso de la iniciativa llevada a cabo por la UE. El cultivo de microalgas y las posibilidades que estas ofrecen las han posicionado como uno de los puntos principales de las políticas “Blue Growth”, basadas en el desarrollo sostenible de los ecosistemas marítimos y costeros a medio plazo [7]. En líneas generales, se trata de un proyecto que apoya el crecimiento sostenible, así como la innovación y el desarrollo tecnológico a partir de los mares y océanos [7]. En Europa, se considera que la economía “azul” genera un valor añadido de unos 500 billones €/año, donde la revalorización de la biomasa de microalgas es uno de sus puntos fundamentales [1].

### 4.1. Definición y características de las microalgas

Las microalgas son microorganismos unicelulares capaces de realizar la fotosíntesis. Son las principales productoras de la cadena trófica y en consecuencia, primeras productoras de materia orgánica, en multitud de ecosistemas [8]. Como organismos fotosintéticos, son esenciales para mantener la vida en la Tierra, ya que proporcionan oxígeno y compuestos orgánicos reducidos [8].

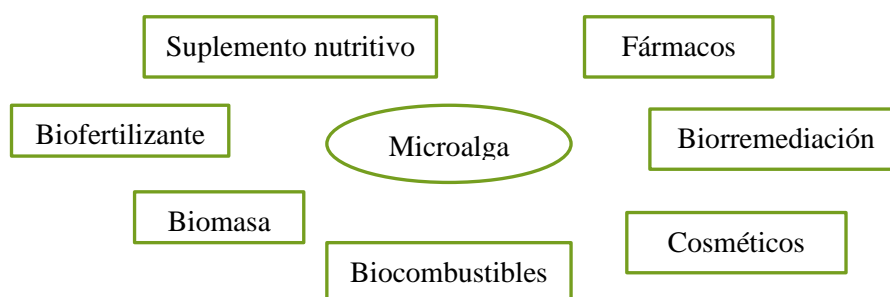
En cuanto a su composición bioquímica, las microalgas cuentan con una gran variedad de pigmentos, citocromos, ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga, etc. Este tipo de moléculas se encargan de conferirles la capacidad de sintetizar productos de alto valor industrial [8]. Una de las estrategias más recurrentes para lograr un aumento en la producción de ciertas fracciones es la

modificación de las condiciones de cultivo con el fin de encontrar el ambiente idóneo que favorezca la formación del producto de interés (habitualmente bajo condiciones de estrés). Su gran biodiversidad y su capacidad de adaptación a diversos ecosistemas permiten utilizarlas en diferentes campos industriales [8].

#### 4.2. Interés industrial sobre las microalgas

Durante los últimos años, las microalgas han ido adquiriendo un mayor protagonismo en la biotecnología. Se conoce que existen varios millones de especies de microalgas. Si las comparamos con las 250.000 especies de plantas conocidas, esto nos da una idea de las posibilidades y versatilidad de los productos y aplicaciones aún por descubrir en estos microorganismos [1]. Sin embargo, son las macroalgas las más estudiadas en este campo, siendo muchas especies de microalgas un recurso natural considerado aún sin explotar [6]. Además, en las últimas décadas el empleo de microalgas como modelo biológico ha ido cobrando interés en la investigación por su flexibilidad metabólica y características fisiológicas [6].

Recientemente, se han extendido ampliamente los campos de aplicación de las microalgas a nivel industrial, ya que estas ofrecen un sinnúmero de posibilidades que explican el incremento de interés sobre ellas (véase Figura 1).



*Figura 1:* Diferentes usos del cultivo de microalgas

Las aplicaciones principales descritas hasta ahora del cultivo de microalgas gracias al desarrollo tecnológico y a la explotación comercial son [6]:

**Aumento de la biomasa mediante modificaciones de las condiciones de cultivo.** Para obtener la mayor cantidad posible de biomasa microalgal es necesario controlar multitud de parámetros físico-químicos en su cultivo, entre ellas, concentraciones de multitud de nutrientes, de sales, fotoperiodo, intensidad de luz y temperatura, etc. El valor de los parámetros que se considerarán óptimos para un sistema de cultivo de microalgas será seleccionado y estudiado según la especie que se pretende cultivar, para conseguir las condiciones óptimas de crecimiento para una determinada especie [9].

Uno de los parámetros más importantes es la intensidad lumínica [10]. Cuando no hay limitación por nutrientes, la fotosíntesis se incrementa con el aumento de la intensidad lumínica, hasta que se alcanza la máxima tasa de crecimiento específica para cada especie [11].

El control de la temperatura es también una de las variables más significativas, ya que muchas especies son muy sensibles a las variaciones de temperatura que ocurren durante el proceso. La producción de microalgas aumenta proporcionalmente con la temperatura hasta que se alcanza la temperatura óptima de cada especie que, por lo general, oscila entre los 28° y 35°C [11].

Otros parámetros determinantes para obtener un buen rendimiento en el cultivo de microalgas son: el pH, la concentración de CO<sub>2</sub>, los nutrientes presentes en el medio, así como los métodos para evitar o combatir la presencia de zooplancton “depredador” en los sistemas de cultivo abiertos y la concentración de oxígeno disuelto [9].

A parte de todos estos parámetros, también es necesario destacar el estudio y desarrollo de los sistemas de cultivo a lo largo de los años. En un principio, se empleaban sistemas de cultivo abiertos, pero los problemas de control de variables y las contaminaciones dieron lugar a los fotobiorreactores o sistemas cerrados [12]. En *Nannochloropsis gaditana*, las condiciones de cultivo han sido muy estudiadas con el fin tanto de aumentar su producción de biomasa, como de aumentar la producción de sus fracciones de interés [13].

**Acuicultura.** Actualmente, la acuicultura es una industria que produce más de la mitad de proteínas de origen animal para el consumo humano [1]. Esto la posiciona como una herramienta fundamental que hace frente a uno de los mayores retos a nivel mundial: la erradicación del hambre. Con una población global que crece y crece, es necesario encontrar nuevas fuentes proteicas que contribuyan a este fin [14]. La acuicultura es, además, una actividad económica muy importante, ya que el pescado es uno de los productos más demandados a nivel mundial [1]. Sin embargo, esta industria todavía cuenta con una gran dependencia del pienso y los aceites de pescado [1], por lo que las microalgas suponen un gran avance como sustitutivo en este campo. Además, estos microorganismos son productores primarios de precursores (ácido eicosapentaenoico EPA, ácido docosahexaenoico DHA) de ácidos grasos beneficiosos, por lo que el contenido nutricional que pasaría a la cadena trófica sería mucho mayor que el conseguido con los piensos comunes [1]. La utilización de microalgas en acuicultura se describe como una actuación que produce mejores resultados de crecimiento y supervivencia de las especies de peces en relación a dietas inertes (piensos) [15]. El uso más extendido de las microalgas hasta el momento se trata de la alimentación de moluscos y rotíferos, así como de peces superiores, siendo además utilizadas como complemento dietético en peces [6]. La implicación de estos microorganismos como soporte trófico de diferentes especies varía entre una demanda máxima y durante toda la vida de la especie (como es el caso de la producción de moluscos bivalvos) y una demanda durante un breve periodo de tiempo [16]. Una de las aplicaciones más importantes en este campo es el empleo de las microalgas



durante el estado larvario del organismo cultivado, ejerciendo estas una influencia positiva sobre el estado fisiológico de las larvas, lo que se traduce en la obtención de alevines de peces de elevada calidad [16].

Dado que *Nannochloropsis spp.* presenta altos contenidos de EPA [17], la inclusión de esta en los piensos para acuicultura la convierte en un potencial sustitutivo de los aceites de pescado empleados hasta el momento [18].

**Tratamiento de aguas.** Las microalgas son actualmente empleadas para el tratamiento de aguas residuales, detoxificación biológica y control de metales pesados en aguas naturales o industrialmente contaminadas. Con este tratamiento se busca eliminar multitud de contaminantes presentes en las aguas residuales, como la demanda bioquímica de oxígeno (DBO), sólidos suspendidos, nutrientes, coliformes y toxicidad [11,19]. En las condiciones adecuadas, las microalgas tienen una capacidad depuradora denominada ficorremediación [11,19], que se define como el uso de macroalgas y/o microalgas para la eliminación o biotransformación de contaminantes, desde aguas residuales y desde un medio gaseoso [19,20]. Además de la capacidad de eliminar contaminantes de las aguas residuales usando las microalgas como tratamiento, es un método muy eficiente y económico para cultivarlas. Aunque de esta manera ya no serían aptas para el consumo humano, existen multitud de aplicaciones y salidas industriales para las cuales seguirían siendo óptimas [1]. Hay muchos factores involucrados en las capacidades depuradoras de las diferentes especies de microalgas [11,19], por lo que estas capacidades deben verificarse bajo las condiciones ambientales locales, mediante ensayos “in-situ” para cada situación. Principalmente, las microalgas son empleadas para el tratamiento de aguas residuales provenientes de procesos industriales, reactores biológicos y escorrentías agrícolas, aunque se está investigando su aplicación en aguas de otras procedencias [21]. Este método presenta ventajas conforme a los tradicionales debido a que los organismos pueden transformar o reducir los productos residuales, asimilándolos o eliminándolos [1].

**Biomedicina.** Las microalgas pueden ser utilizadas como suplementos dietéticos o en el tratamiento de diversas enfermedades humanas: desde las asociadas al colesterol hasta diferentes tipos de lesiones. También ha sido descrita su actividad antibiótica e incluso antifúngica [1]. Recientemente, ha sido demostrada en diversas publicaciones la capacidad de las microalgas para tratar enfermedades relacionadas con desórdenes inmunológicos, además de su capacidad antiinflamatoria o incluso para prevenir la aparición de determinados tipos de cáncer [1]. En este ámbito, nuestro grupo ha desarrollado una proteína con capacidad antitumoral (UCA01) a partir de una proteína de *N. gaditana* (Nº de patente P201930775) [22].

Muchas de las especies son valoradas por sus propiedades medicinales. Por ejemplo, protegen contra la insuficiencia renal y la proliferación de *Lactobacillus* intestinales [9,23]. Se ha determinado que la incorporación a la dieta de ciertas microalgas aumenta el nivel de antioxidantes (inhibiendo la acción de

los radicales libres) [24]. Por otra parte, los polisacáridos, monosacáridos y ácidos grasos son una fuente altamente importante para la creación de fármacos contra tumores [25], y tienen un importante papel en la reducción del riesgo de enfermedades cardiovasculares.

**Alimentación humana y pienso animal.** El contenido proteico de las microalgas refleja su alta potencialidad en diversas áreas: pueden ser utilizadas también en la nutrición humana o como complemento de piensos animales [6].

En cuanto al consumo humano de microalgas, de momento está limitado a pocas especies debido al estricto control existente sobre seguridad alimentaria, factores comerciales, demanda del mercado, etc. Esto provoca que conseguir certificados como el popular “Novel Food” [26] sea un proceso largo y costoso. Actualmente, los 4 géneros más destacados en este campo son *Chlorella spp.*, *Arthrospira spp.*, *Dunaliella spp.* y *Tetraselmis spp.*, que son comercializados en forma de suplementos alimentarios [9,23,27,28].

Por su parte, el 30% de la producción mundial de microalgas se destina a la alimentación animal, ya que algunos géneros como *Nannochloropsis spp.*, *Chlorella spp.*, *Scenedesmus spp.* y *Arthrospira spp.* tienen aspectos beneficiosos para los animales: mejoran la respuesta inmune, la infertilidad, el control del peso... Además, proporcionan características saludables o beneficiosas para el consumo humano y producen una piel más sana y un pelo brillante [9,23,27].

**Industria cosmética.** Se basa en la producción de fracciones de interés: vitaminas, pigmentos, fitol, aminoácidos, polisacáridos, glicerol, enzimas, factores de crecimiento en procesos fermentativos, ceras, fosfolípidos y lecitinas, ácidos grasos esenciales y prostaglandinas [6]. Algunas especies de microalgas se emplean para el cuidado de la piel, tales como *Arthrospira spp.* y *Chlorella spp.*, elaborándose cremas antiedad, productos regenerantes de la piel, antiirritantes... [27]. Por ejemplo, extractos ricos en proteínas de *Arthrospira spp.* reparan los signos prematuros del envejecimiento de la piel, ejercen un efecto tensor y previenen la formación de estrías. También tienen especial relevancia en este campo *C. vulgaris* y *Nannochloropsis oculata* [27].

**Industria energética.** Se engloban en este grupo los lípidos algales utilizados para la producción de biocombustibles, aunque a pesar de ser una de las aplicaciones que despertó más interés en un principio [6], a lo largo de los años de investigación se ha comprobado que no es tan rentable como se pensaba. *N. gaditana* fue una de las especies más estudiadas en este campo debido a su alto contenido en ácidos grasos [4].

**Ómicas e ingeniería genética.** Las llamadas técnicas “-ómicas” han revolucionado la ciencia y sus aplicaciones en microalgas. La combinación de la genómica, metabolómica y proteómica son actualmente la punta de lanza de la biotecnología, permitiendo procedimientos y descubrimientos imposibles hace unos años [5]. Las técnicas “-ómicas” se basan en la investigación y estudio de genes,

proteínas y reacciones metabólicas, así como en la interacción entre ellos. Se dividen de manera general en genómica (estudio del genoma), metabolómica (análisis de las reacciones metabólicas), transcriptómica (estudio del ARN mensajero) y proteómica (estudio de todas las proteínas existentes en un organismo en un momento y condición determinada). El desarrollo de estas técnicas ha logrado transformar la investigación científica hasta entonces conocida [29]. La proteómica nos permite identificar nuevas proteínas con potenciales industriales, transformando los proteomas estudiados en una información de alto valor industrial [5]. Por otra parte, la ingeniería genética es una herramienta muy potente que permite “jugar” con el genoma de especies hasta conseguir la cepa o características deseadas para la industria [29]. Esta revisión se enfocará hacia la parte de la proteómica y la proteómica aplicada.

La proteómica es capaz de identificar y cuantificar todas las proteínas expresadas por un microorganismo en un momento determinado. Esta gran cantidad de información nos permite entender el comportamiento biológico en un momento dado, ante unas condiciones ambientales determinadas [1]. Se define entonces la proteómica como la ciencia que estudia el proteoma, que es el conjunto de proteínas de una célula, un tejido o un organismo biológico [29].

Estas proteínas son el resultado de la expresión de los miles de genes y variaciones (mutaciones) que componen el ADN, del procesamiento del ARN, así como de las transformaciones post-traduccionales que sufren [29]. Conocer el proteoma en toda su extensión es uno de los mayores retos a los que se enfrenta la biología moderna, y supone un gran avance, ya que las proteínas son las encargadas de controlar las funciones biológicas. De hecho, actualmente es el objetivo del Proyecto Proteoma Humano (HPP) promovido por la Human Proteome Organisation (HUPO) [29].

En los últimos 10 años, se han producido muchos avances en el campo de la manipulación genética de las microalgas [5]: desde la expresión de transgenes usando el novedoso mecanismo de los “ribointerruptores” para la regulación de genes [30], pasando por el conjunto de promotores nucleares y luciferasa como gen “reporter” para la expresión del gen insertado [31], hasta el uso de la expresión génica inducible del cloroplasto [32]. En el caso del análisis de microalgas, la proteómica permite la identificación del proteoma de la especie correspondiente, agrupándose posteriormente las proteínas en función de la actividad molecular y biológica que lleven a cabo [29]. De esta manera, si se conoce la actividad biológica de la proteína, es posible la inhibición o activación de rutas en las que intervengan con el fin de aprovechar al máximo el contenido proteico del organismo [29]. Uno de los objetivos fundamentales de la proteómica es comparar el proteoma de un sistema biológico (por ejemplo, el de una especie de microalgas) en condiciones distintas, para identificar cuáles son las proteínas distintas en ambos estados, así como las sobreexpresadas para identificar su función [29]. Esto nos ofrece una gran información.

**Proteómica aplicada.** Este nuevo enfoque proteómico nos permite identificar proteínas de diverso interés industrial en un análisis proteómico convencional. Esta nueva técnica es capaz de transformar datos proteómicos en una información de alto valor industrial. Es el caso de *N. gaditana*, donde se identificaron más de 400 proteínas con aplicaciones industriales directas, gracias al desarrollo de un algoritmo bioinformático. Esta técnica ha permitido el desarrollo de una proteína recombinante como tratamiento antitumoral, la cual ha sido probada con éxito en líneas celulares tumorales de hígado y colon.

#### 4.3. *Nannochloropsis gaditana*

Dentro de la infinidad de especies de microalgas con aplicación en la biotecnología, cabe destacar la importancia de *Nannochloropsis gaditana* [33]. Aislada de la Bahía de Cádiz, se trata de una especie conocida especialmente en los ecosistemas marinos, aunque también ha sido encontrada en agua dulce y salobre. En cuanto a su morfología, se tratan de pequeñas esferas (2  $\mu\text{m}$ ) no móviles y con una pared celular muy resistente (ver Figura 2) [17]. Además, están desprovistas de flagelos y poseen un cromatóforo de color verde pálido que ocupa gran parte de la célula. El citoplasma es fuertemente basófilo, pudiéndose observar mediante técnicas de tinción una gran acumulación de lípidos en su interior [33].

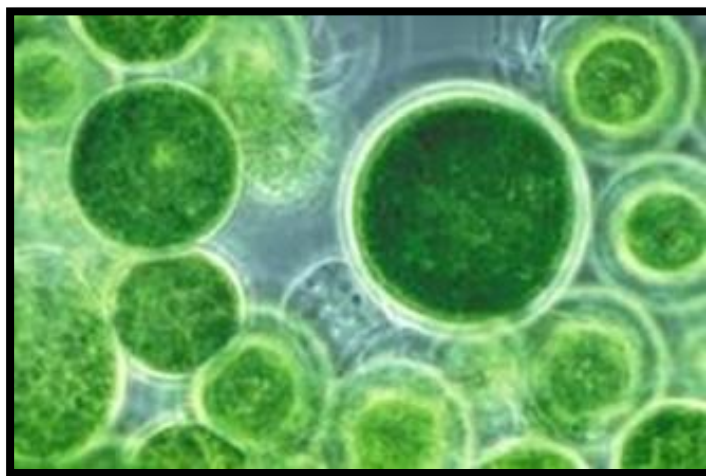


Figura 2: Imagen de *N. gaditana*. Tomada de SEMS (Sociedad Española de Microalgas y Subproductos). *Nannochloropsis gaditana*. Recuperado el 17 de Junio de 2020, de <https://www.seaweed.es/productos/nannochloropsis-gaditana/>

Esta especie perteneciente a la clase *Eustigmatophyceae* se diferencia de las otras dos especies pertenecientes al mismo género (*N. oculata* y *N. salina*) en su capacidad para producir  $\alpha$ -caroteno (además de otros pigmentos) cultivadas en las mismas condiciones [33]. Los carotenoides son unos pigmentos muy demandados debido a los múltiples usos con los que cuentan (sustancias farmacológicas, aditivos alimentarios, alta capacidad antioxidante...) [33].

Actualmente, sus principales aplicaciones se basan en convertirse en alimento para el cultivo de otros organismos superiores (acuicultura) [17]. Por ejemplo, debido a su alto contenido en EPA es muy útil para la alimentación de rotíferos, así como para peces y moluscos. Además, también se utilizan como inóculos para comenzar nuevos cultivos y en técnicas de tratamiento de aguas: mejoran la calidad del agua para evitar que los peces cultivados contraigan enfermedades acuícolas [17]. Fijándonos en la Tabla 1, se puede observar tanto su alto contenido proteico, que será de gran utilidad para el potencial desarrollo biotecnológico que ofrece la especie, como la capacidad de acumulación de otros productos de interés [17].

Pero no son estos los últimos conocimientos aportados por esta especie. Recientemente, mediante el estudio del proteoma, se han descubierto infinidad de aplicaciones que van desde el sector agroalimentario hasta la biomedicina, con más de 400 proteínas con aplicaciones directas encontradas. Han sido localizadas más de 100 proteínas relacionadas con el tratamiento del cáncer, más de setenta en el tratamiento tumores, pero también relacionadas con el tratamiento de la diabetes, enfermedades de la próstata o pulmones, y esto solo en el campo de la biomedicina.

| Composición   | %    |
|---------------|------|
| Proteínas     | 52   |
| Carbohidratos | 12   |
| Lípidos       | 28   |
| EPA           | 37   |
| ARA (*)       | 5    |
| Vitamina C    | 0.85 |
| Clorofila A   | 0.89 |

(\*) Ácido araquidónico

*Tabla 1:* Tabla tomada de SEMS (Sociedad Española de Microalgas y Subproductos). *Nannochloropsis gaditana*. Recuperado el 17 de Junio de 2020, de <https://www.seaweed.es/productos/nannochloropsis-gaditana/>

## 5. Objetivos

---

Debido al incremento en el número de publicaciones relacionadas con microalgas y a que estas se han convertido en una fuente potencial de bioproductos, el presente Trabajo Final de Grado tiene como objetivo global dar una visión general de las aplicaciones industriales alcanzadas gracias al desarrollo de la biotecnología, deteniéndonos en el caso particular de *N. gaditana*.

Este objetivo principal, puede a su vez, desglosarse en varios objetivos específicos:

- I. Realizar una revisión sobre las aplicaciones industriales de las microalgas.
- II. Describir la situación biotecnológica particular de *Nannochloropsis gaditana* y esclarecer sus características y potenciales aplicaciones.
- III. Explicar cómo las técnicas “-ómicas” han revolucionado la biotecnología de microalgas y cómo ayudan al desarrollo industrial de todos sus campos.
- IV. Definir el concepto de proteómica aplicada, así como las perspectivas de futuro con las que cuenta y las potenciales aplicaciones de esta nueva técnica biotecnológica.

## 6. Contenido

---

En los últimos años, las microalgas se han convertido en un importante recurso industrial y de investigación. Por este motivo, durante este TFG, se describirán las aplicaciones industriales más importantes para las microalgas y especialmente aquellas centradas en torno a *N. gaditana*, especie de la Bahía de Cádiz con un alto contenido en PUFAs. Se desarrollarán aquellas aplicaciones que han revolucionado el cultivo y la industria de estas, desde sus orígenes como prometedores productores de biodiesel, hasta probablemente, la más novedosa: la “proteómica aplicada”. Actualmente, el ecosistema marino y en particular, las microalgas, suponen una enorme fuente de recursos para el mundo de la biotecnología, por lo que es necesario que se encuentren en continua revisión.

### 6.1. Estudio de las condiciones de cultivo

Cualquier cultivo microbiológico de carácter industrial puede tener dos objetivos principales: producir biomasa o aumentar la concentración de algún metabolito de interés. En el cultivo de microalgas las condiciones de cultivo son especialmente determinantes para la obtención de la biomasa deseada o de la fracción de interés industrial que se quiere producir. Por este motivo, se hace necesaria una optimización del procedimiento a seguir en función de la microalga a utilizar y la motivación de la producción, lo que incluye la variación de multitud de parámetros. En esta revisión se exponen los principales parámetros a modificar, su relevancia industrial y biológica. Los parámetros de cultivo son muy diversos y variables, haciendo muy difícil y laboriosa la elección idónea de los mismos. Estos quedan resumidos en la Tabla 1 de los apéndices. Los parámetros que actualmente destacan e influyen especialmente en el cultivo de estos microorganismos son:

- Luz
- Temperatura
- Regulación del pH y del CO<sub>2</sub>
- Nutrientes
- Oxígeno disuelto
- Diseño de fotobiorreactores

**Luz.** La intensidad lumínica es uno de los parámetros más importantes a la hora de realizar un cultivo de microalgas, ya que estas son organismos fotosintéticos [10]. Si no existe una limitación de nutrientes, la fotosíntesis será directamente proporcional a la intensidad lumínica proporcionada hasta que se alcance una tasa de crecimiento máxima que varía según la especie (punto de saturación por luz) [11]. En el momento en el que este punto se sobrepasa, se alcanza el punto de fotoinhibición, que produce efectos perjudiciales en la célula, bajando la productividad del cultivo [10,11,34,35]. Por ejemplo, los

cultivos exteriores suelen experimentar este fenómeno de fotoinhibición durante las principales horas del día, ya que la intensidad lumínica en este periodo es muy alta [35].

**Temperatura.** La producción de microalgas es también directamente proporcional a la temperatura hasta que se alcanza la temperatura óptima, que depende de la especie que se quiera cultivar. Si esta temperatura se supera, se produce la fotorrespiración y se reduce la productividad. La temperatura óptima, por lo general varía entre los 28° y 35°C [11], dependiendo de la cepa seleccionada. Si se cuenta con un sistema cerrado, es posible controlar la temperatura introduciendo el reactor en un invernadero [35]. En estos casos, como se produce evaporación, se puede regular la temperatura añadiendo agua más fría y con sombra. En cambio, si se ha decidido llevar a cabo el cultivo en un sistema abierto, la temperatura será más difícil de controlar [11,35,36].

**La regulación del pH y del CO<sub>2</sub>.** El pH del medio de cultivo viene determinado por varios factores: la productividad algal, la respiración, la alcalinidad y la concentración de iones en el medio, la actividad microbiana y el sistema de aporte de CO<sub>2</sub> [11,35]. Al igual que ocurre con el resto de parámetros, cada especie tiene un pH con el que crece de manera óptima [35]. En el caso de las especies de agua dulce, este pH se encuentra en torno a 8 [11]. Si este valor varía, la productividad baja [11]. Para controlar el pH del medio, basta con contar con un sistema de inyección de CO<sub>2</sub> o de adición de ácido o base [35,37,38].

De igual forma, es importante tener en cuenta las necesidades de CO<sub>2</sub> del cultivo: los costos asociados a este factor son elevados y por ello es importante tratar de eliminarlos [39,40]. Las microalgas son capaces de fijar el CO<sub>2</sub> debido a su actividad fotosintética [41]. Esto supone un beneficio para los humanos, ya que se captan contaminantes atmosféricos perjudiciales en nuestra especie. Es esencial controlar de manera exhaustiva la inyección de CO<sub>2</sub> ya que se pueden producir acidificaciones en el medio que sean letales para el cultivo [41]. Como con todas las variables, se necesita encontrar el punto óptimo para maximizar la producción de biomasa.

**Nutrientes.** Varios son los nutrientes esenciales que se deben aportar al medio para lograr un buen cultivo de microalgas. Tras el carbono, uno de los más importantes es el nitrógeno, que se añade en forma de amonio o nitrato [35,42,43]. Este tiene una importante función en la acumulación de lípidos que las microalgas son capaces de llevar a cabo: mientras que en condiciones normales, el contenido lipídico con el que cuentan es del 20%, cuando el nitrógeno se convierte en un factor limitante la acumulación de lípidos aumenta hasta un 40% [11,44], con el objetivo de fluidificar la membrana. Sin embargo, es importante valorar en qué proporción se produce esta limitación, ya que esto implica también una reducción de la productividad [11], por lo que será conveniente establecer los objetivos deseados antes de comenzar el cultivo.



También es de gran importancia el fósforo, que participa en los procesos de formación de ácidos nucleicos y transferencia de energía [43]. Suele incorporarse al medio en forma de  $\text{HPO}_4^{2-}$  o  $\text{HPO}_4^-$  [35,43].

Por supuesto, el agua es un componente vital en el medio de cultivo tanto para el transporte como para aportar los electrones necesarios para reducir el  $\text{CO}_2$  [8]. Con el objeto de reducir los costes asociados al medio utilizado, se emplean aguas residuales como potencial medio de cultivo [6]. Además, el valor del producto final extraído suele compensar los costes consumidos en el proceso de cultivo [6].

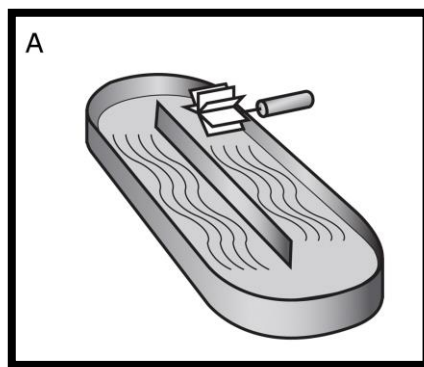
Por último, cloruro, sodio, potasio, calcio, magnesio y azufre son iones que aparecen en los medios en grandes cantidades, aunque a veces no se consuman. Su función principal consiste en mantener la presión osmótica y el equilibrio iónico [8]. El magnesio, por ejemplo, es el ión central que aparece en el núcleo de porfirina de las clorofilas.

Encontrar un medio de cultivo adecuado supone identificar la especie previamente para buscar un medio con las mejores características. Por ejemplo, el medio f/2 es uno de los más utilizados en el cultivo de microalgas [8] (ver tabla 2 de los apéndices).

**Oxígeno disuelto.** Debido a la intensa fotosíntesis llevada a cabo por las microalgas durante el cultivo, los niveles de oxígeno disuelto pueden aumentar hasta llegar a una saturación superior al 200%. Esta elevada saturación puede afectar a la productividad [9] inhibiendo el crecimiento de la especie de interés [45]. Esta saturación por oxígeno puede ser evitada mediante un efectivo sistema de absorción de aire que elimine el exceso de oxígeno [45]. Sin embargo, hay que controlar que en esta salida de aire no disminuyan bruscamente los niveles de  $\text{CO}_2$ , normalmente empleando para ello una inyección simultánea de este gas [45].

**Diseño de fotobiorreactores.** En el cultivo de microalgas existen 2 diseños básicos: cultivos abiertos, normalmente en exteriores, donde la biomasa se encuentra expuesta a las condiciones medioambientales; y cerrados, normalmente en interiores, aislados del medio externo [10,46]. La elección del sistema de cultivo dependerá del producto final que se desee obtener a partir de la biomasa, además de la disponibilidad de recursos hídricos y/o suelo [35,36].

En cuanto a los **sistemas abiertos**, el Raceway Pond es el más utilizado [46,47], (ver Figura 3), en el que un sistema de paletas de mezcla vertical permite una exposición intermitente de las células a la luz [11].



*Figura 3:* Cultivo tipo carrusel (Raceway). Tomada de Hernández-Pérez, A., & Labbé, J.I. (2014). Microalgas, cultivo y beneficios. *Revista de biología marina y oceanografía*, 49(2), 157-173.

Este es uno de los sistemas más rentables, ya que puede ser utilizado para el tratamiento de aguas residuales de distintas fuentes [19,42,47,48], lo que reduce los costes asociados a los requerimientos nutricionales del cultivo [40,42]. Entre las ventajas de este tipo de sistemas destacan su reducido coste, la facilidad de construcción y operación y la alta durabilidad [19,35,42,48]. Por otra parte, las principales desventajas radican en la baja accesibilidad de las células a la luz, la evaporación, la necesidad de grandes superficies y, sobre todo, en la exposición continua a la posible contaminación por parte de organismos heterótrofos y/o zooplancton [10,19,35,46,47]. Este último factor es una de las principales problemáticas de la contaminación, y puede ser tratado mediante filtración, centrifugación, baja concentración de oxígeno disuelto, aplicación de hormonas miméticas contra invertebrados, aumento de pH y concentración de amonio libre [11].

Estas desventajas llevaron al desarrollo de los **sistemas cerrados** [10,35,36,46], que permiten un preciso control de todos los parámetros y variables físico-químicas y evitan la contaminación como una de las principales ventajas. Además, permiten realizar cultivos hiperconcentrados pudiendo obtenerse una alta densidad celular [10]. Sin embargo, la construcción de este tipo de sistemas o la formulación del medio de cultivo requerido suponen un alto coste [49]. Dicho coste puede ser reducido utilizando materiales eficientes, pero de bajo coste, aguas residuales como medio de cultivo o disminuyendo el gasto de energía [50].

Además de todos los parámetros mencionados, otro factor relevante es la **especie de microalga** que se emplee. En función de la especie que se desee cultivar, los parámetros variarán y las condiciones óptimas serán distintas. Se elegirá la especie en función del producto que se quiera obtener. Las especies que predominan en un sistema abierto dependerán de los factores ambientales y operacionales y de los parámetros biológicos [11,42,51], mientras que en un sistema cerrado se pueden lograr cultivos de una sola especie aislados del medio ambiente [9].

Una mejora de todos estos parámetros y una buena elección de las condiciones óptimas para el cultivo conducirá a un mejor rendimiento y obtención de los productos de interés, por lo que su estudio

será de vital importancia en el proceso. Además, unas condiciones de cultivo efectivas producirán una mejora de la viabilidad económica, así como del impacto medioambiental que pueda llegar a tener el cultivo.

Es muy importante establecer el objetivo del cultivo previamente. En líneas generales, los intereses pueden ser dos: por un lado, intentar aumentar al máximo la producción de biomasa de microalgas, y por otro, potenciar la obtención de las fracciones de interés [1]. Para aumentar la concentración de la fracción de interés, se suelen emplear condiciones de estrés, limitando algún nutriente o condición físico-química, como el fotoperiodo o la temperatura [1]. Una de las fracciones de interés más importante en el caso de las microalgas son los ácidos grasos poliinsaturados (PUFAs). Actualmente, se emplean diferentes métodos en el cultivo de microalgas para incrementar la concentración de estos compuestos. El estrés en los cultivos de microalgas produce por norma general el aumento de la concentración de PUFAs; en contra punto se obtiene una menor cantidad de biomasa total debido al estrés [69]. En conclusión, es necesario establecer un equilibrio entre las condiciones requeridas para lograr una mayor producción de biomasa y/o de la fracción de interés en cuestión, y encontrar así las condiciones óptimas entre la producción de biomasa y la concentración de la fracción de interés.

En cuanto al problema ocasionado acerca del coste de los medios de cultivo, actualmente una de las estrategias más recurrentes es el uso de “residuales” (aguas domésticas, industriales...) utilizadas como un medio de cultivo efectivo para el cultivo de microalgas. Esta técnica posibilita el crecimiento de las microalgas disminuyendo el coste de producción [6]. Entre los residuos más valiosos actualmente se encuentran: lejías bisulfíticas, residuos celulósicos, quitina de exoesqueletos y almidón [6].

Con respecto a la cosecha y recolección posterior de la biomasa, diversos estudios confirman que las técnicas de centrifugación, filtración, sedimentación con ultrasonidos, y flotación no son tan eficientes como las técnicas de floculación [52]. Su sencilla aplicación junto con su alta eficiencia la posicionan como uno de los mejores métodos de cosecha, pero actualmente aún quedan algunos retos que superar: los floculantes pueden contaminar el compuesto acuoso y las microalgas, disminuyendo por tanto el valor de la biomasa, así como sus posibles usos comerciales, además de impedir la recirculación en los cultivos [53].

En el caso de *Nannochloropsis gaditana*, como especie perteneciente a la clase *Eustigmatophyceae*, es conocida por su alta producción lipídica [54]. La productividad de estas algas depende principalmente de las condiciones de cultivo [13]. Las investigaciones confirman que también los factores ambientales afectan a la composición bioquímica de las especies de *Nannochloropsis* [55]. Según los resultados de estudios realizados con el fin de optimizar los parámetros para la obtención de lípidos a partir de *N. gaditana* [13], se observó que esta especie alcanzaba su máximo índice de acumulación lipídica cuando era sometida a un alto estrés salino [13]. En cuanto al pH, el máximo índice

de crecimiento se alcanzó a pH 8, así como la máxima tasa de producción lipídica. Esto quiere decir que el pH alcalino induciría la acumulación lipídica [13]. Al determinar la intensidad lumínica óptima, se observó que a la intensidad de 2000 lux se obtenía un mayor crecimiento y una mayor producción lipídica, aplicando un fotoperiodo de 16:8 horas [13]. En el caso de la temperatura, la tasa de crecimiento mayor se obtuvo a 25°C y la producción lipídica máxima a 30°C [13]. Con todos estos parámetros optimizados (ver tabla 3 de apéndices) se mejoró el rendimiento lipídico hasta un 40% [13]. En este caso, el interés de *N. gaditana* eran sus aceites (PUFAs), que cuentan con un alto valor nutricional. Dependiendo de las fracciones de interés deseadas, estos parámetros variarán en mayor o en menor medida.

## 6.2. Acuicultura

La acuicultura ha sido el primer uso industrial conocido de las microalgas, adquiriendo una gran relevancia en los últimos años. Esta técnica ha ido cobrando una gran importancia, convirtiéndose en la mejor aliada para la protección de los ambientes marinos, debido a la sobreexplotación a la que son sometidos los ecosistemas marinos y costeros [56]. Con vistas al futuro, se espera que sea la acuicultura la industria principal encargada de proporcionar productos acuáticos a los seres humanos [56].

Recientes estudios demuestran que las microalgas, además de contar con un papel fundamental en el tratamiento de aguas residuales en acuicultura, podrían sintetizar componentes valiosos como proteínas, lípidos y pigmentos naturales, cuyos beneficios pueden ser transmitidos a los peces que se alimenten de la especie en cuestión [56]. Los géneros más utilizados son: *Chlorella spp.*, *Tetraselmis spp.*, *Scenedesmus spp.*, *Pavlova spp.*, *Phaeodactylum spp.*, *Chaetoceros spp.*, *Nannochloropsis spp.*, *Skeletonema spp.* y *Thalassiosira spp.*, ya que tienen rápidos índices de crecimiento aportando propiedades beneficiosas a los peces alimentados [57]. De hecho, investigaciones llevadas a cabo con algunas de las especies que pertenecen a los géneros comentados han resultado exitosas para la producción de biomasa con valor añadido, lo cual puede explotarse con el fin de reemplazar la alimentación en acuicultura y mejorar la inmunidad de animales acuáticos [57–59]. Para ello, las microalgas deben contar con una adecuada composición nutricional y estar exentas de toxinas que puedan transmitirse a lo largo de la cadena trófica [60]. Además, gracias a la acuicultura basada en microalgas, se reduce la presión generada sobre los ecosistemas para la elaboración de harinas y aceites de pescado [1]. Dado que son numerosas las ventajas obtenidas con la acuicultura asistida por microalgas, se espera que la implementación industrial de la tecnología de microalgas sea en un futuro próximo una buena solución frente a los problemas presentes en la acuicultura tradicional [56]. Por otra parte, la principal desventaja radica en que las especies de peces no aumentan su tamaño con la misma rapidez si su alimentación se basa exclusivamente en microalgas [1].

En 2014, el 30% de la producción mundial de microalgas se destinaba a la alimentación animal [61], pero en acuicultura su uso se limita principalmente a larvas, moluscos y crustáceos [62]. Otro de los usos principales de las microalgas en este campo es el tratamiento de aguas residuales provenientes de la propia acuicultura, que han sido enriquecidas con diferentes componentes. Las microalgas se encargan de eliminar el exceso de estos componentes de los efluentes en acuicultura, a un coste bajo y con una alta eficiencia, siendo un ejemplo de economía circular [63]: se convierten en un alimento para los peces, liberando así la explotación a la que se están viendo sometidos los recursos pesqueros, a la vez que minimizan los residuos generados en este tipo de actividades, mediante su capacidad de asimilación de compuestos nocivos [1]. De esta manera, se reducen los costes de sistemas de depuración de aguas al mismo tiempo que se consigue el cultivo de peces.

En el caso de la alimentación animal, las microalgas se utilizan en acuicultura como alimento vivo en todas las fases del desarrollo de moluscos bivalvos (ostras, vieiras, almejas y mejillones), en las fases jóvenes de orejas de mar, crustáceos y algunas especies de peces, y para el zooplancton empleado en las cadenas tróficas [60]. Las microalgas que tienen buenas propiedades nutricionales como monoespecies o dentro de una dieta mezclada son *C. calcitrans*, *C. muelleri*, *P. lutheri*, *Isochrysis spp.*, *T. suecica*, *S. costatum* y *Thalassiosira pseudonana* [64–66]. Con respecto a la alimentación larvaria destacan *Chaetoceros spp.*, *Thalassiosira spp.*, *Tetraselmis spp.*, *Isochrysis spp.* y *Nannochloropsis spp.* [57]. La combinación de varias de estas especies proporciona una nutrición más equilibrada y mejora el crecimiento del pez en comparación con el uso de una sola especie [27]. El contenido proteico, vitamínico y de ácidos grasos poliinsaturados (PUFAs) son factores que determinan el valor nutricional de la especie [57]. Por tanto, el uso de microalgas como aditivos en procesos de acuicultura ha ido ganando más interés a lo largo de los años, debido al efecto que estas producen en la deposición de proteínas y grasas en el músculo, la resistencia a enfermedades, la reducción del impacto ambiental, el aumento de la digestibilidad de los peces, la actividad fisiológica, así como la tolerancia a la inanición o la calidad del canal, mejorando las propiedades del producto para consumo humano [67].

Pero no es únicamente la alimentación animal la labor con la que cumplen las microalgas en la acuicultura. Especies como *Dunaliella salina*, *Haematococcus pluvialis*, y *Spirulina* son una fuente de pigmentos naturales para el cultivo de gambas, salmones y otros peces [57]. *Chlorella spp.* y *Arthrospira spp.* son comúnmente incluidas en la alimentación de peces ornamentales en los que su coloración es una importante herramienta de mercado [68–70]. Existen estudios que demuestran que los pigmentos transferidos a través del zooplancton podrían contribuir al valor nutricional [71]. Por ejemplo, el pigmento de la luteína, común en la microalga verde *Tetraselmis spp.* podría ser empleado para incrementar el valor nutricional de *Artemia spp.*: la luteína podría ser convertida a vitamina A si se usa la especie como alimento de estos crustáceos [57].

En cuanto a *N. gaditana*, su principal aplicación en acuicultura reside en la alimentación de peces. Incluso se comercializa con *N. gaditana* un producto empleado para la alimentación de rotíferos [72]. Gracias a dicho producto se consigue aumentar el tamaño y el peso de las larvas, así como su tasa de supervivencia, rasgos fundamentales en el campo de la acuicultura. Su composición bioquímica, su extraordinario perfil de ácidos grasos como omega-3, su fácil manejo, su concentración y su alta capacidad de resuspensión, hacen que este sea un producto destacable en el enriquecimiento de rotíferos [72].

### 6.3. Tratamiento de aguas

Otro de los usos más extendidos de las microalgas es la ficorremediación: las microalgas poseen la capacidad de llevar a cabo la descontaminación de aguas [11,19,73]. Principalmente, las microalgas son utilizadas para el tratamiento de aguas residuales, aunque cualquier cultivo de microalgas, al captar CO<sub>2</sub> y emitir O<sub>2</sub>, está contribuyendo a mitigar el efecto invernadero [1].

Muchas de las especies encontradas en determinadas aguas contaminadas se utilizan para el tratamiento de aguas residuales, por su alta tolerancia a esos mismos contaminantes y su capacidad para degradarlos o asimilarlos [11,42,47]. Por ejemplo, los géneros *Chlorella spp.*, *Ankistrodesmus spp.*, *Scenedesmus spp.*, *Euglena spp.*, *Chlamydomonas spp.*, *Oscillatoria spp.*, *Micractinium spp.*, *Golenkinia spp.*, *Phormidium spp.*, *Botryococcus spp.*, *Arthrospira spp.*, *Nitzschia spp.*, *Navicula spp.* y *Stigeoclonium spp.* han sido encontrados en aguas residuales de distintas procedencias [19,36,42].

Una de las aplicaciones más importantes y que está siendo objeto de estudio recientemente es el empleo de microalgas para eliminar contaminantes procedentes de la industria farmacéutica [74]. Los últimos estudios revelan que las microalgas utilizan tres vías bioquímicas para la eliminación de este tipo de contaminantes: bioadsorción, bioacumulación y biodegradación (extra e intracelular) [1]. Es decir, las microalgas tienen la capacidad de asimilar e incorporar este tipo de compuestos mediante las tres vías mencionadas en su metabolismo o en las propias células [1].

En estudios recientes sobre la utilización de microalgas para el tratamiento de aguas residuales urbanas se registraron valores de eliminación de DBO del 68,4% [42]. En 2010, se logró una remoción del 67,4% en cultivos de *Scenedesmus obliquus* alimentados con aguas residuales procedentes de la producción de aceite de oliva [23]. En el mismo período, se consiguió una importante reducción de un 91,4% en tratamientos de estiércol en granjas con microalgas [75].

Otro de los puntos importantes en el tratamiento de aguas es la eliminación del nitrógeno y fósforo. Las microalgas son eficientes en la eliminación de estos compuestos porque son nutrientes esenciales para la formación de biomasa [76], por lo que incorporan el nitrato, fósforo y amonio de una forma rápida mediante absorción directa [77]. En la Tabla 4 de apéndices se adjuntan resultados de remoción de nutrientes de diversos estudios. En el caso de *Chlorella vulgaris*, presenta una eficiencia de remoción

del 86% para nitrógeno inorgánico y 70% para fósforo inorgánico [42,77]. Por otra parte, en otras investigaciones se logró hasta un 100% de la eliminación del amonio empleando cultivos de *Chlorella spp.* [78]. Tal y como se observa en la tabla 4 de los apéndices, la eliminación de nitrógeno y fósforo empleando microalgas ha proporcionado resultados muy favorables en aguas residuales de distinta procedencia: municipales altamente concentradas con *Chlorella spp.* [79], residuos agroindustriales con *Chlorella pyrenoidosa* [80], o residuos de laboratorio con *Chlorella spp.* y *Scenedesmus spp.* [81]. Por último, diversas investigaciones prueban que la técnica de inmovilizar las microalgas durante el proceso, haciendo uso de esferas de alginato, aumenta la capacidad de eliminación de nutrientes frente a una técnica con algas sin inmovilizar, ya que de esta manera se permite una mejor cosecha de la biomasa [82].

En tercer lugar, las microalgas configuran un papel fundamental en la eliminación de metales pesados. Estos son especialmente conocidos por su toxicidad y su papel como agentes cancerígenos, siendo por tanto contaminantes en aguas industriales [83]. Algunas microalgas tienen la capacidad de eliminar este tipo de sustancias, ya que poseen una carga superficial negativa que les confiere una alta afinidad por los iones de metales pesados [84], introduciéndolos posteriormente por adsorción, absorción y formación de fitoquelatinas [85]. Por tanto, como se observa en la tabla 4 de los apéndices, las microalgas son consideradas un método económico y eficiente para la eliminación de metales pesados, resultando un efluente de alta calidad [19,42,85]. Por ende, se consigue un sistema muy eficiente a la vez de muy barato, ya que se ahorran los costes que suponen los sistemas y las infraestructuras dedicados a la eliminación de estos compuestos. Este método ha resultado muy útil en diversas industrias, por ejemplo: se logró una eliminación del 99% de los metales disueltos en aguas procedentes de explotaciones mineras [42]. Además, aunque existan multitud de especies capaces de adaptarse fisiológicamente a las condiciones de estrés que suponen este tipo de ambientes, es el género *Scenedesmus spp.* el más ampliamente estudiado, ya que cuenta con capacidades probadas para eliminar  $U^{6+}$ ,  $Cu^{2+}$ ,  $Cd^{2+}$ ,  $Zn^{2+}$ ,  $Co^{2+}$  y  $Cr^{6+}$  [86–88].

Las microalgas han demostrado su capacidad para encargarse de la eliminación de los organismos patógenos presentes en las aguas residuales. Principalmente enterobacterias (*Escherichia coli*, *Salmonella spp.* y *Shigella spp.*), virus y protozoos [42], son un indicativo de contaminación fecal de aguas. Esto se debe a que el medio de cultivo en el que crecen las microalgas es desfavorable para los microorganismos patógenos, principalmente por los niveles de pH a los que se encuentra [84]. También es posible la erradicación de coliformes. Sin embargo, a diferencia de las aplicaciones anteriores, debido al altísimo nivel de patógenos presentes en las aguas contaminadas, las concentraciones en los efluentes pueden estar por encima de los niveles permitidos y ser necesaria una desinfección posterior adicional [82].

Aunque en este área la capacidad para restaurar aguas residuales de diferentes procedencias de *Nannochloropsis gaditana* aún no ha sido estudiada, otras especies del mismo género, como *N. oculata* sí que han mostrado tener potenciales aplicaciones para la fitorremediación, concretamente para la eliminación de elementos como el cromo [89]. Por ello, futuras investigaciones con esta microalga de la bahía gaditana podrían resultar eficientes en este campo.

#### 6.4. Biomedicina y farmacología

Las microalgas son una fuente de multitud de diferentes moléculas orgánicas con potenciales aplicaciones en la industria biofarmacéutica (péptidos, proteínas, carbohidratos, terpenos, ácidos grasos poliinsaturados, flavonoides, compuestos fenólicos, vitaminas, porfirinas y otras sustancias orgánicas) [90]. Estos compuestos han demostrado tener actividad farmacológica capaz de tratar enfermedades autoinmunes, infecciosas e incluso tumorales: bactericidas, reguladores de la respuesta inmune, antioxidantes, citoprotectores, fungicidas y antivirales [90].

Entre los principales compuestos con actividad biológica que han sido identificados y aislados a partir de microalgas, se encuentran [90]:

- a. Carbohidratos. En este grupo destacan los fucoidanos, que son polisacáridos sulfatados. Se asocian con la regulación del sistema inmune, inhibición de la proliferación celular y actividad antiviral [90]. Además, ocho estudios realizados en humanos evalúan su efecto anticoagulante [91]. Polisacáridos sulfatados como las laminarias también cobran importancia por sus propiedades probióticas, bactericidas, antivirales, antitumorales, anti-apoptóticas, antiinflamatorias, anticoagulantes y antioxidantes [90].  
Otra importante familia de carbohidratos son los alginatos, polímeros lineales capaces de formar estructuras coloidales y tener propiedades antiinflamatorias y antibacterianas. Son muy aplicados en la farmacología, ya que pueden realizar una liberación controlada de fármacos debido a la presencia de nanoporos de 5nm en las cápsulas que forman [92].  
Por ejemplo, la noscomina, extraída de *Nostoc commune* tiene propiedades antibióticas, así como el norbietano de *Microcoleus lacustris*, o el ambigol C de *Fisherella ambigua* [90].
- b. Lípidos. En las microalgas también se han encontrado elevadas cantidades de ácidos grasos poliinsaturados [90]. Entre los lípidos más representados están el  $\beta$ -caroteno, la fucoxantina y el tocoferol. Otros ácidos grasos identificados como el palmítico, el láurico, el linolénico, el oleico o el esteárico tienen potenciales efectos como antibióticos y agentes antifúngicos [90].
- c. Polifenoles. Conocidos por su poder antioxidante, también los compuestos fenólicos extraídos de *Nostoc muscorum* presentan propiedades antibióticas [93].
- d. Péptidos y proteínas. El aparato fotosintético de las microalgas, entre otras de las partes de su organismo, cuenta con una gran cantidad de proteínas con infinidad de propiedades. Las



ficobiliproteínas de los fotosistemas han demostrado tener actividades antioxidantes, inmunoreguladoras, antivirales, antitumorales y neuroprotectoras [90]. Las ficobiliproteínas están formadas por una parte proteica y una cromófora (ficobilina) unidas por un enlace covalente. Destacan la ficocianina de *Arthrospira spp.* y ficoeritrina de *Porphyridium spp.*, que han sido utilizadas en ensayos de inmunofluorescencia [94]. Su uso es inocuo y altamente beneficioso, demostrándose por ejemplo, que *Spirulina maxima* y *Pseudanabaena tenuis* tienen efectos antioxidantes y antiinflamatorios en diferentes modelos que generan estrés oxidativo y, en consecuencia, daño celular [95]. Por su parte, ha sido probado que *Chlorella vulgaris* previene también el estrés oxidativo y el daño celular renal de ratones expuestos a intoxicación con  $\text{HgCl}_2$  [96].

Debido a la potencialidad de todos estos productos extraídos se han realizado multitud de estudios y proyectos para buscar aplicaciones farmacéuticas a partir de microalgas, no solo de los compuestos descritos anteriormente. *Arthrospira spp.*, *Botryococcus spp.*, *Chlorella spp.*, *Dunaliella spp.*, *Haematococcus spp.* o *Nostoc spp.* son algunas de las especies que cuentan con mayor aplicación en la biomedicina actualmente [1]. Por ejemplo, a partir de *Dunaliella salina* se extrae una proteína antigénica de la hepatitis B, a partir de *Chlorella vulgaris* la hormona del crecimiento, a partir de *Chlamydomonas reinhardtii* eritropoietina, proinsulina e incluso interferón  $\beta$  [1].

El cáncer, es actualmente una de las enfermedades que más afecta a la población, provocando en muchas ocasiones la muerte [97]. La búsqueda de nuevos componentes obtenidos de fuentes naturales para el tratamiento del cáncer es cada vez más necesaria debido a la toxicidad y a veces baja especificidad de los componentes empleados en los tratamientos de quimioterapia o radioterapia, así como los efectos secundarios de los mismos [98]. Diversos estudios confirman la presencia de un “microambiente” con bajo poder antioxidante en las células tumorales de órganos como pulmón, hígado, páncreas o estómago, por lo que compuestos con una alta actividad antioxidante podrían ayudar a controlar los procesos carcinogénicos [99]. Los carotenoides, por ejemplo, poseen propiedades antitumorales. Se ha comprobado que en combinación con agentes quimioterapéuticos como el 5-fluorouracil, facilitan la remoción completa en el cáncer colorrectal [100]. Péptidos con actividad hidrolítica aislados de *C. vulgaris* inhiben el crecimiento celular de carcinoma gástrico en la fase post-G1 de la mitosis, teniendo incluso más efecto que el Trolox (compuesto de referencia), sugiriéndose así que los péptidos podrían ser complementos potencialmente útiles en el tratamiento del cáncer gástrico [99]. También son especialmente relevantes en el efecto antitumoral generado por las microalgas, los lípidos peroxidados derivados del DHA. Estos suelen ser tóxicos para la célula, mostrando efectos anticancerígenos que se materializan en la mitocondria y el núcleo. Las mitocondrias responden al estrés induciendo un proceso apoptótico: las DHA son rápidamente incorporadas a la membrana mitocondrial y provocan la muerte celular [101]. Por otra parte, el estudio del sistema inmune ha revelado su estrecha relación con los procesos tumorales y en consecuencia con el tratamiento del cáncer [102]. Hasta el

momento son muchas las especies de microalgas con actividad inmunomoduladora testada [98], como se observa en la tabla 5 de los apéndices. Recientemente, un grupo de investigación de la Universidad de Cádiz ha patentado un antitumoral [22] obtenido a partir del proteoma de *Nannochloropsis gaditana*.

### 6.5. Alimentación humana y pienso animal

El uso de las microalgas como fuente de proteínas y/o suplementos nutricionales para la alimentación animal y humana se remonta tradicionalmente a poblaciones nativas [103]. *Spirulina* (*Arthrospira spp.*), que es una de las principales especies empleadas en la alimentación, era históricamente cosechada por los aztecas que vivían en las inmediaciones del lago mexicano Texcoco, y actualmente por poblaciones locales que habitan la región del lago Kossorom en Chad [104].

Actualmente, además del beneficio que constituye una alimentación basada en las propias microalgas, el interés de las industrias se centra en los metabolitos secundarios producidos por las mismas con una alta actividad biológica [27], con el objeto de producir suplementos nutricionales y alimentos funcionales. A raíz de observar que las poblaciones que consumían microalgas estaban protegidas frente a las enfermedades cardiovasculares debido a la ingesta de ácido eicosapentaenoico (EPA, C20:5n-3), se descubrieron unos de los bioproductos más importantes de las microalgas: los PUFAs, que destacaban por su actividad antitrombótica [103,105]. Aunque con el paso del tiempo, la atención se ha ido centrando en los compuestos antioxidantes, como carotenoides o polifenoles [103]. Para las aplicaciones en la industria alimenticia, la biomasa que va a ser utilizada debe tener un contenido de agua menor del 10%, ya que la humedad contribuye al deterioro del producto algal propiciando el crecimiento de bacterias, hongos o mohos [106].

Una de las mayores ventajas de las microalgas reside en su capacidad para sintetizar una alta cantidad de proteínas, lo que las hace excepcionales como fuente nutricional. Por ejemplo, *S. platensis* y *C. vulgaris* cuentan con un contenido proteico del 50-60% de su peso seco [106]. El valor nutritivo de las proteínas derivadas de las microalgas depende fundamentalmente del grosor de la pared celular, que puede convertirlas en imposibles de digerir por los humanos [106]. Para disminuir este efecto, se llevan a cabo diferentes métodos de disrupción de la pared celular (ultrasonificación, lisis enzimática, microfluidización...) [107]. La creciente población mundial y consecuentemente el insuficiente aporte de nutrientes ha provocado una búsqueda continua de nuevas fuentes proteicas, asegurando las microalgas un futuro prometedor debido al alto nivel de aminoácidos esenciales que poseen, junto con un bajo contenido de ácidos nucleicos [106].

Otro de los compuestos extraídos de las microalgas con un alto interés en la industria alimentaria es el  $\beta$ -1,3-glucano, una fibra natural soluble con propiedades terapéuticas como: reductor del colesterol en sangre, antioxidante y estimulador del sistema inmune [106]. Puede ser utilizado como sustituto de grasas en productos texturizados, como pan funcional, sopas “ready-to-serve”, o snacks funcionales

[108]. A partir del cultivo de cepas de *Chlorella spp.*, *Isochrysis galbana* y *Euglena spp.* es posible obtener este compuesto [106].

Los lípidos son una parte fundamental de la estructura de las microalgas y cuentan con un gran potencial en la industria [106]. El ácido oleico (C<sub>18:1</sub>) es el principal ácido graso monoinsaturado (MUFA) y actualmente, la empresa Solazyme and Bunge comercializa con este extracto algal en Brasil como una alternativa más saludable ante los aceites que provienen de grasas saturadas, teniendo un gran éxito en el ámbito culinario [109]. Por supuesto, como ya se ha revisado, los PUFAs son uno de los compuestos con mayor interés en la industria alimenticia actualmente, y las microalgas son fuente primaria de los mismos [106]. Dentro de estos, se engloban los ácidos grasos  $\omega$ -3 y  $\omega$ -6, que para la salud humana deben ser ingeridos en la dieta (esenciales). Por ejemplo, el  $\omega$ -3 es fundamental para el cuerpo humano, ya que es el precursor de prostaglandinas, tromboxanos y eicosanoides leucotrienos, relacionados con funciones como: coagulación sanguínea, presión vascular, prevención del cáncer...[110]. Por su parte, ácidos grasos  $\omega$ -6 como el araquidónico (ARA) han mostrado efectos antiinflamatorios y son utilizados como suplemento dietético. La corporación DSM comercializa leche infantil enriquecida con estos dos ácidos grasos, extraídos de microalgas [106].

A pesar de ser una fuente de numerosos beneficios, pocas especies de microalgas han sido aprobadas para estar incluidas dentro de la dieta de los humanos, probablemente debido a la dificultad que supone probar la ausencia de toxicidad y a los estrictos controles de seguridad que exige la legislación actual [103]: la cianobacteria *Spirulina* (*Arthrospira platensis*), *Chlorella pyrenoidosa*, *Chlorella vulgaris*, *Chlorella luteoviridis*, *Odontella aurita* y *Tetraselmis chui* [103]. Tradicionalmente, *Spirulina spp.* y *Chlorella spp.* se venden directamente como suplementos dietéticos, siendo Asia el área geográfica donde más se comercializa [106].

No son sólo los humanos la especie que se beneficia de todas estas propiedades. Ya se ha revisado el potencial de las microalgas como alimento para peces, pero también está siendo investigado su potencial como pienso para animales de granja. El Instituto Tecnológico de Costa Rica (TEC) cuenta con un laboratorio de microalgas, dónde estas son cultivadas desde hace 12 años con el fin de beneficiar a empresas privadas [111]. Compañías como Porcina Americana se benefician de este producto, abaratando los costes de producción de la carne y desarrollando una fuente de alimento con un alto contenido proteico, que además es respetuoso con el medio ambiente. En el inicio del plan piloto, la empresa produjo hasta 30 toneladas de biomasa a partir de microalgas (*Arthrospira spp.*), que fueron aprovechadas también para limpiar las aguas residuales de la granja [112].

El género de *Nannochloropsis spp.* ha sido clasificado por el Joint Research Centre como una buena fuente de EPA, extraído y comercializado como suplementos nutricionales para la dieta humana, además de confirmar que no se habían encontrado ningún tipo de toxinas en este género [113]. Concretamente, *N. gaditana* es una importante fuente de EPA, un ácido graso crucial para el buen

funcionamiento del sistema nervioso y de la visión, además de ser altamente recomendable para las embarazadas [103]. Actualmente, esta especie es utilizada sobre todo en acuicultura, aunque los beneficios que sean transferidos a estas especies acuáticas llegarán también a la alimentación humana mediante la cadena trófica [1]. *N. gaditana* fue utilizada en el proyecto “Algae for Healthy World” (A4HW), liderado por ENDESA, con la Universidad de Cádiz como coordinador técnico donde se exploraron las aplicaciones agroalimentarias de esta microalga para el consumo humano (Laboratorio de Investigación Gastronómica del Chef del Mar, AINIA, NEOALGAE), así como para aumentar la concentración de los biocompuestos de alto valor añadido para el sector de la alimentación (pigmentos, antioxidantes, etc.) [114].

#### 6.6. Industria cosmética

En el campo de la cosmética son de vital importancia los pigmentos presentes en las microalgas: clorofilas, carotenoides, ficobilinas, etc. Por ejemplo, la clorofila a es un potente agente desodorante empleado como componente para los productos de higiene personal (desodorantes y pastillas) [108]. Por su parte, dentro de los carotenoides, la astaxantina es uno de los pigmentos más importantes y beneficiosos para el consumo humano: tiene un alto potencial anti-envejecimiento debido a sus propiedades antioxidantes, favorece el crecimiento del cabello y se utiliza en la fabricación de muchas cremas solares debido a la actividad protectora que posee frente a los rayos UV [108,115]. Los bio-productos derivados de las microalgas cuentan con una gran importancia en el mercado mundial. Por ello, Europa apuesta por convertirse en una de estas potencias en los próximos años [116]. Por ejemplo, a partir del cultivo de *Spirulina* existe la “Protulina”, una crema con propiedades beneficiosas frente al envejecimiento de la piel [113]. Debido a la alta capacidad de las microalgas para sintetizar un amplio rango de aminoácidos, un interesante producto cosmético ha sido comercializado: un péptido algal derivado de la arginina con propiedades para el cuidado de la piel [106]. Como ya se ha comentado, las microalgas se caracterizan por su alto contenido en PUFAs, que engloban los ácidos  $\omega$ -3 y  $\omega$ -6. Exsymol también es el fabricante de un producto basado en lípidos procedentes de *Spirulina platensis* del tipo ácido  $\gamma$ -linoleico (GLA), un ácido  $\omega$ -6 con propiedades anti-envejecimiento.

*Haematococcus pluvialis* es una de las especies de microalgas con un mayor contenido de astaxantina, pigmento que previene la flacidez facial, a la vez que aporta luminosidad y suaviza las arrugas, protegiendo a la piel frente a los radicales libres (antioxidante) [115]. Por otra parte, las ficobilinas son empleadas por sus propiedades antioxidantes en productos para el cuidado de la piel, basada en la ficocianina de ciertas algas; así como también presentan propiedades hidratantes, como la ficoeritrina obtenida a partir de *Porphyridium cruentum* [36].

### 6.7. Industria energética

Las microalgas empezaron a ser investigadas en la última década por su posible aplicación en la industria energética [1]. La búsqueda de energías renovables y sostenibles es uno de los principales retos a los que se enfrenta la población hoy en día, ya que los llamados recursos “no renovables” se están empezando a agotar [1]. Actualmente, solo un 10% de la energía total producida procede de fuentes renovables [117]. Las microalgas se han posicionado como una posible alternativa a los combustibles fósiles, ya que son capaces de captar la energía solar y almacenarla en forma de energía química [1]. Entre las principales ventajas que abarcan, cabe destacar su alta productividad, su capacidad para ser cultivadas en diferentes condiciones y para captar CO<sub>2</sub> de diferentes fuentes [1]. Pero sobre todo, el principal interés de los investigadores se centra en su capacidad para acumular lípidos que pueden ser transformados, de una manera más o menos sencilla, en biodiesel [118].

Sin embargo, es necesario encontrar especies que acumulen una alta cantidad de lípidos a la vez que generen biomasa rápidamente, y para ello también es imprescindible un ajuste equilibrado de las condiciones de cultivo. Una de las alternativas más exploradas es el uso de la ingeniería genética para introducir características deseadas en las distintas especies, con el fin de lograr estas condiciones en un futuro próximo [1].

Las microalgas también son una opción muy válida y especialmente “eco-friendly” para la generación de bio-hidrógeno, empleando algunas de sus rutas metabólicas que ofrecen unos resultados mucho más limpios que otras técnicas, como la electrólisis o la fotólisis. Sin embargo, esta técnica también necesita ser depurada porque actualmente supone unos altos costes [1]. La Unión Europea se encarga de fomentar y financiar este tipo de investigaciones, ya que uno de sus objetivos primordiales se fija en la consecución de fuentes de energía renovables [119]. De esta manera, surgen programas de innovación e investigación como Horizonte2020 [120] o BlueGrowth, donde las microalgas se contemplan como uno de los principales puntos de la política del proyecto [7].

### 6.8. Ómicas e ingeniería genética

A mediados del siglo XX tiene lugar un hecho que provocará un cambio fundamental en la manera de entender el funcionamiento de los organismos vivos: la aparición de la biología molecular y el desarrollo de herramientas que permitían su estudio mediante la generación de gran cantidad de información en poco tiempo, mediante las técnicas “-ómicas” (genómica, transcriptómica, metabolómica y proteómica) [121].

Con el descifrado del genoma humano a finales del siglo XX, se puso de manifiesto el interés por comprender la información presente en otros niveles moleculares (ARN, proteínas, metabolitos...), así como las interacciones entre ellos [121]. A partir de las técnicas desarrolladas en las ciencias “-ómicas”

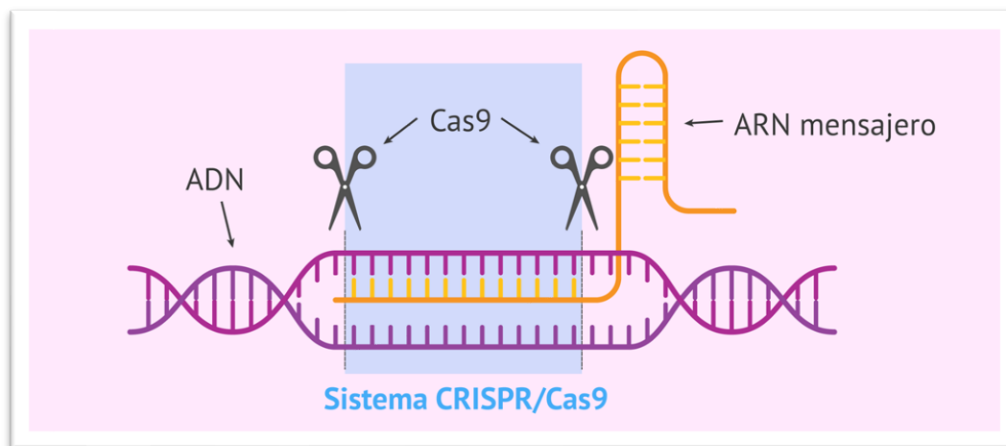
es posible analizar la información que ofrecen los distintos elementos de la biología molecular, obteniéndose una gran cantidad de datos relevantes en poco tiempo a partir de una única muestra [121]. Es necesario recalcar que a pesar de que cada una de las ciencias “-ómicas” ofrezca mucha información de manera individual, es la integración de los datos derivados de todas ellas lo que permite captar toda la complejidad biológica [121].

En primer lugar, la genómica se dedica al estudio del genoma, es decir, del conjunto de secuencias de ADN que hay en un organismo. Abarca dos amplios campos: la genómica estructural, dedicada a la localización de los genes (originando los mapas genéticos); y la funcional, que trata de identificar la función de los genes [121]. Si se sigue el dogma de la biología molecular, de la genómica se pasa a la transcriptómica, que estudia el conjunto de todos los ARNs presentes en un organismo, proporcionando información de qué genes se expresan en un momento dado en un organismo determinado [122]. La traducción de este ARN daría lugar a las proteínas, objetivo fundamental de la proteómica, que estudia el conjunto de todas las proteínas y modificaciones post-traduccionales expresadas en una célula, tejido u órgano en un momento determinado y bajo unas condiciones ambientales específicas [121]. Por último, es también relevante la disciplina de la metabolómica, que se encarga del estudio del conjunto de metabolitos que intervienen en las distintas rutas en un momento determinado, ya sean sintetizados *de novo* o que provengan del exterior [121].

La ingeniería genética para la selección de caracteres de interés en las microalgas ha sufrido un gran avance en la última década [5]. Por supuesto, dentro de los avances generados en los últimos años en el campo de la biología molecular, destacan las técnicas de secuenciación que han permitido obtener todo el material genético de un organismo rápidamente. Reconocida como uno de los avances científicos más importantes del siglo XX, la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) es una manera muy rápida y sencilla de crear copias ilimitadas de ADN a partir de una hebra original [123]. En tan sólo unas horas, se puede obtener la cantidad de ADN necesario para realizar un análisis. Así, a partir de una pequeña muestra se puede amplificar el ADN, siendo posible la detección de enfermedades o contaminantes en un producto. En estos últimos meses, se ha convertido en una herramienta fundamental para la detección del virus SARS-CoV-2, demostrando una vez más ser uno de los avances más importantes de la historia de la ciencia.

De la misma forma, las herramientas de edición del genoma han supuesto un salto biotecnológico, destacando principalmente el sistema CRISPR/Cas9. Descubierto en 2013, forma parte del sistema inmune adaptativo de las bacterias, y es un complejo proteico compuesto por endonucleasas y pequeños fragmentos de ARN [5]. Este sistema utiliza un ARN “guía” que reconoce al ADN diana y se une a él por complementariedad de bases. De esta manera, es posible editar el genoma por múltiples sitios en un solo ensayo de CRISPR/Cas9 [5]. Esta tecnología ha resultado ser la más efectiva en la edición del genoma de microalgas, como así lo muestran muchos de los estudios publicados [5].

*Chlamydomonas reinhardtii* fue el primer genoma de microalgas editado haciendo uso de esta herramienta [124]. Desde el origen de esta tecnología, múltiples son las aplicaciones que se han ido desarrollando, como por ejemplo la represión de múltiples genes probada en *Synechocystis spp.* [125], o incluso la producción mejorada de succinato en *Synechococcus elongatus* PCC 7942 [126].

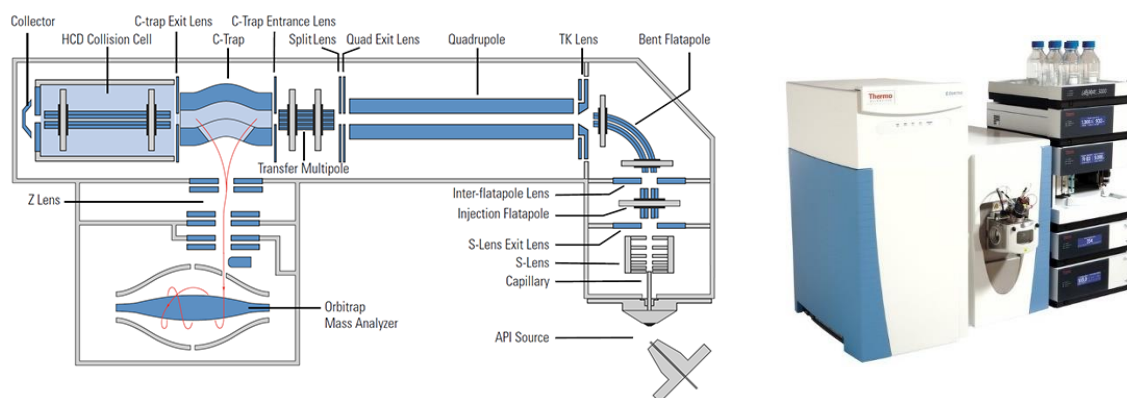


**Figura 4:** Sistema CRISPR/Cas 9. Tomado de: El sistema CRISPR/Cas9. <https://www.reproduccionasistida.org/autorizacion-de-modificacion-de-embryones/sistema-crispr-cas9/> (accessed August 17, 2020). [127]

La proteómica, es una de las “-ómicas” con mayor desarrollo y aplicación actualmente en la biotecnología. El término de “proteómica” se acuñó a principios de los 90, cuando la metodología mejoró hasta el punto de obtener resultados reproducibles y poder identificar proteínas con gran precisión [128]. El principal avance fue el descubrimiento de los gradientes de pH inmovilizados (IPGs) y la mejora de los geles de electroforesis de poliacrilamida. Las proteínas que se aislaban de estos genes, ahora podían ser directamente secuenciadas, aunque fue el desarrollo de las técnicas de identificación mediante espectrometría de masas (MALDI-TOF o MALDI-TOF-MS) lo que permitió un uso más generalizado de los geles [128]. Actualmente, estos equipos tan sofisticados identifican las muestras sin necesidad de aislar previamente la proteína en un gel, por lo que los geles han pasado en este aspecto a un segundo plano [128]. Gracias a esta ciencia, se puede entender qué está pasando en un organismo en un momento determinado, ya que hay proteínas relacionadas con el estrés metabólico, que en el momento que este desaparece dejan de expresarse. Por ello, la proteómica está estrechamente relacionada con el ambiente, ya que las proteínas expresadas por un organismo difieren dependiendo en las condiciones en las que este se encuentre [1]. La genómica, en contrapartida, permite conocer información acerca de qué genes se transmitirán a la siguiente generación, facilitando así la selección de poblaciones que tengan un carácter de interés.

La proteómica nos permite entender el funcionamiento de un organismo en un momento determinado, gracias a su conjunto de proteínas y sus niveles de expresión. Por ejemplo, en el caso de

los PUFAs, que es uno de los productos de mayor interés industrial presente en las microalgas, son sintetizados en mayor número en unas condiciones determinadas, en las cuáles el pool de proteínas expresados es distinto que en condiciones normales [1]. Dentro de este “pool” o “set”, no sólo se pueden encontrar proteínas clave para la acumulación de PUFAs, sino también para el tratamiento contra el cáncer, precursores de aditivos de interés, o incluso para el tratamiento de aguas contaminadas [1]. En los estudios de proteómica aplicada, si se encuentra una proteína beneficiosa se induciría su producción, y en cambio si fuese perjudicial se bloquearía la ruta metabólica que la generase. La estrategia básica seguida por las técnicas de proteómica se basa en extraer el componente proteico de la especie en cuestión, procesar las proteínas obtenidas para obtener los péptidos que las componen, separar dichos péptidos mediante técnicas cromatográficas e identificarlos mediante espectrometría de masas de alta resolución [29] (ver figura 5). Actualmente, la proteómica es un campo en continua evolución, que avanza a pasos agigantados. De hecho, sus métodos están siendo ya empleados en la rutina clínica, tanto en el diagnóstico de biopsias como en la identificación de especies bacterianas asociadas a procesos infecciosos [29].



**Figura 5:** Sistema de espectrometría de masas de alta resolución. Tomado de: Thermo Fisher Scientific - ES. <https://www.thermofisher.com/es/es/home.html> (accessed September 18, 2020) [129].

El amplio campo de las “-ómicas” ha revolucionado el descubrimiento de los productos naturales, ofreciendo un conjunto de herramientas y tecnologías que permiten explorar productos naturales utilizando organismos unicelulares [130]. Así, la proteómica junto con el resto de “-ómicas” trabajan para extraer el verdadero valor que presentan las microalgas [1]. Esto quiere decir, que si se expresan los genes correctos (propios o introducidos a partir de otro organismo) dentro del microorganismo seleccionado, será más fácil obtener el producto de interés en mayores cantidades (beneficio industrial). Este enfoque llevará en un futuro al diseño de microalgas, seleccionando las características más favorables y eliminando las indeseadas para la optimizar la producción de la molécula de interés que requiera el sector industrial en cuestión [1]. Un estudio reciente empleó las secuencias de 500 péptidos seleccionados con el algoritmo de PeptideRanker obtenidos a partir de



*Tetrademus obliquus*, encontrando 25 enzimas antioxidantes y convertidoras de angiotensina. 4 de los 25 péptidos encontrados fueron sintetizados y confirmaron las mismas actividades una vez probados in vitro. Con este hallazgo, podría ser realizado un cribado virtual para identificar compuestos de interés [131]. De esta manera, el creciente número de softwares, herramientas, bases de datos... prometen un amplio rango de descubrimientos de fármacos de manera mucho más focalizada [132].

El concepto de proteómica aplicada surge como consecuencia de emplear los resultados obtenidos en los estudios del proteoma de organismos no modelo para usos industriales, como hongos (*Botrytis cinerea*) o en el caso que se describe, microalgas (*Nannochloropsis gaditana*). El uso de organismos no modelo supone una fuente potencial de nuevas proteínas, que a su vez podrán desempeñar una importante función en algunos de los campos descritos. Mientras que los organismos modelo cuentan con un comportamiento y unos componentes perfectamente descritos, los no modelo ofrecen un sinfín de nuevas características que pueden ser aprovechados por diversas industrias [1].

En concreto, la investigación de proteómica aplicada llevada a cabo en la Universidad de Cádiz utiliza el proteoma de *Nannochloropsis gaditana*. Esta especie de microalga no flagelada se ha convertido en el eje fundamental del laboratorio. A partir del análisis MS/MS de todo el proteoma de *N. gaditana* se han logrado identificar 1950 proteínas [4] gracias a un algoritmo bioinformático creado por la Universidad de Córdoba. Entre todas ellas, hay algunas con aplicaciones biotecnológicas importantes, tanto en biomedicina como en la industria agroalimentaria, entre otras [4]. En un principio, fueron una prohibitina (podía ser utilizada como tratamiento para las enfermedades relacionadas con el control de la replicación celular) y una proteína resistente a *Phytophthora infestans* las proteínas sobre las que más se incidió, debido a sus potenciales aplicaciones [4]. Sin embargo, en los últimos meses todas las miradas han sido puestas en UCA01, proteína recombinante extraída del proteoma de *N. gaditana* con propiedades antitumorales. Se trata de un inhibidor tumoral que sumerge a la célula en un periodo de inactividad mitótica para evitar la proliferación tumoral. Son tres los factores con los que cuenta UCA01 que le permiten desarrollar dicha actividad: su capacidad antioxidante, el aumento de la actividad de la proteína p53 y la protección de la degradación de las mitocondrias [22]. Tanto ha sido el éxito del descubrimiento de esta proteína, que su patente ha sido recientemente aceptada [22], comprobándose una vez más el creciente valor de las especies presentes en la Bahía de Cádiz.

## 7. Conclusiones

---

Durante el presente Trabajo Final de Grado se ha realizado una revisión bibliográfica sobre las aplicaciones biotecnológicas de las microalgas, concretando en el caso de *N. gaditana*. Dicho recorrido ha permitido que se determinen las siguientes conclusiones:

- 1) Las microalgas se han posicionado como un elemento clave con la capacidad de ayudar a solucionar grandes problemas de la humanidad, entre ellos el efecto invernadero, el desarrollo de nuevos fármacos, la producción de superalimentos o la protección del ambiente.
- 2) Las microalgas son una fuente de nuevos bioproductos para agroalimentación, así como la base para el desarrollo de nuevas aplicaciones biotecnológicas. Ejemplo de ello son la ficocianina y la proteína recombinante UCA01.
- 3) Es necesaria una optimización de los parámetros de cultivo para garantizar un rendimiento máximo. La selección de un cultivo de microalgas bajo condiciones de estrés, favorece la acumulación de determinados productos de interés, como en el caso de los PUFAs.
- 4) *Nannochloropsis gaditana* es una de las especies de microalgas más cultivada, debido a su extendido uso en acuicultura. Durante esta revisión se ha demostrado el gran potencial biotecnológico de esta especie, con más de 400 proteínas identificadas con potenciales aplicaciones industriales, obtenidas mediante “proteómica aplicada”.
- 5) La “proteómica aplicada” ha transformado el proteoma de *N. gaditana* en una información de alto valor industrial, identificando proteínas con potenciales aplicaciones industriales directas. Esto ha sido demostrado mediante el desarrollo del agente antitumoral UCA01.

## 8. Perspectivas de futuro

---

Tras la elaboración del presente Trabajo Final de Grado, se establece que las diferentes aplicaciones descritas deberían estar en continua revisión para seguir aprovechando el enorme potencial que guardan las microalgas. El intercambio de resultados entre todos los campos de investigación descritos conducirá a una fuerte expansión de la industria de las microalgas en los próximos años.

Como una de las principales visiones hacia un futuro próximo, se contempla la posibilidad de buscar la “UCA02”, otra de las 400 proteínas obtenidas en el análisis proteómico de *N. gaditana* junto a UCA01, el ya mencionado agente antitumoral. La estrategia a seguir sería la siguiente: seleccionar una proteína con interés industrial y probar su actividad mediante el uso de la misma proteína recombinante para llegar a conseguir el producto de interés en cuestión. Con este *modus operandi* se podría llegar a explorar por completo el proteoma de la especie gaditana, generando así valiosos bioproductos en los próximos años.

Pero no es esta la única especie con la que es posible realizar estudios proteómicos. Otra microalga de gran interés industrial es, por ejemplo, *Chlorella spp.* Debido al alto contenido proteico con el que cuenta esta especie, sería útil, novedoso y alentador para los siguientes años, un estudio de su proteoma que siguiese con la caracterización de multitud de proteínas encontradas para descubrir nuevos bioproductos de interés industrial.

## 9. Bibliografía

---

- [1] R. Carrasco, C. Fajardo, P. Guarnizo, R.A. Vallejo, F.J. Fernandez-acero, Journal of Microbiology and Genetics Review : Biotechnology Applications of Microalgae in the Context of EU “ Blue Growth ” Initiatives, (2018). <https://doi.org/10.29011/2574-7371>.
- [2] R. Carrasco-Reinado, A. Escobar, C. Carrera, P. Guarnizo, R.A. Vallejo, F.J. Fernández-Acero, Valorization of microalgae biomass as a potential source of high-value sugars and polyalcohols, LWT. 114 (2019) 108385. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2019.108385>.
- [3] C. Fajardo, F. Amil-Ruiz, C. Fuentes-Almagro, M. De Donato, G. Martinez-Rodriguez, A. Escobar-Niño, R. Carrasco, J.M. Mancera, F.J. Fernandez-Acero, An “omic” approach to *Pyrocystis lunula*: New insights related with this bioluminescent dinoflagellate, J. Proteomics. 209 (2019) 103502. <https://doi.org/10.1016/j.jprot.2019.103502>.
- [4] F.J. Fernández-Acero, F. Amil-Ruiz, M.J. Durán-Peña, R. Carrasco, C. Fajardo, P. Guarnizo, C. Fuentes-Almagro, R.A. Vallejo, Valorisation of the microalgae *Nannochloropsis gaditana* biomass by proteomic approach in the context of circular economy, J. Proteomics. 193 (2019) 239–242. <https://doi.org/10.1016/j.jprot.2018.10.015>.
- [5] C. Fajardo, M. De Donato, R. Carrasco, G. Martínez-Rodríguez, J.M. Mancera, F.J. Fernández-Acero, Advances and challenges in genetic engineering of microalgae, Rev. Aquac. 12 (2020) 365–381. <https://doi.org/10.1111/raq.12322>.
- [6] L. Gomez, Aspectos ecológicos y biotecnológicos., Rev. Cuba. Química, Vol. XIX, Núm. 2. (2007) 3(19). <https://www.redalyc.org/pdf/4435/443543707001.pdf>.
- [7] European Comission, Blue growth | Maritime Affairs, . [https://ec.europa.eu/maritimeaffairs/policy/blue\\_growth\\_en](https://ec.europa.eu/maritimeaffairs/policy/blue_growth_en) (accessed June 23, 2020).
- [8] J.M. Fernández Sevilla, Microalgas - Definición y características, (2014). <https://w3.ual.es/~jfernand/ProcMicro70801207/tema-1---generalidades/1-1-microalgas.html> (accessed June 16, 2020).
- [9] A. Hernández-Pérez, J.I. Labbé, Microalgas, cultivo y beneficios, Rev. Biol. Mar. Oceanogr. 49 (2014) 157–173. <https://doi.org/10.4067/S0718-19572014000200001>.
- [10] C. Contreras-Flores, J.M. Peña-Castro, L.B. Flores-Cotera, R.O. Cañizares-Villanueva, Avances en el diseño conceptual de fotobiorreactores para el cultivo de microalgas, 2003.
- [11] J.B.K. Park, R.J. Craggs, A.N. Shilton, Wastewater treatment high rate algal ponds for biofuel production, Bioresour. Technol. 102 (2011) 35–42.

- <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2010.06.158>.
- [12] V. Okoro, U. Azimov, J. Munoz, H.H. Hernandez, A.N. Phan, Microalgae cultivation and harvesting: Growth performance and use of flocculants - A review, *Renew. Sustain. Energy Rev.* 115 (2019) 109364. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2019.109364>.
  - [13] S. Markose, A. Chellappan, P. Thangamani, S. George, S. Thangaswamy, C. Thavasimuthu, M. Mariavincent, Optimization of physical parameters for the growth and lipid production in *Nannochloropsis gaditana* (Lubian, 1982), *J. Appl. Biol. Biotechnol.* 8 (2020) 6–12. <https://doi.org/10.7324/JABB.2020.80302>.
  - [14] The State of World Fisheries and Aquaculture 2020, FAO, 2020. <https://doi.org/10.4060/ca9229en>.
  - [15] E. Ponis, R. Robert, G. Parisi, Nutritional value of fresh and concentrated algal diets for larval and juvenile Pacific oysters (*Crassostrea gigas*), *Aquaculture*. 221 (2003) 491–505. [https://doi.org/10.1016/S0044-8486\(03\)00075-9](https://doi.org/10.1016/S0044-8486(03)00075-9).
  - [16] J. Cañavate, Funciones de las microalgas en acuicultura, *Las Algas Como Recur. Valorización. Apl. Ind. y Tendencias*. 2025 (2011) 193–205.
  - [17] SEMS (Sociedad Española de Microalgas y Subproductos), *Nannochloropsis gaditana*. <https://www.seaweed.es/productos/nannochloropsis-gaditana/> (accessed June 17, 2020).
  - [18] M. Sørensen, Y. Gong, F. Bjarnason, G.K. Vasanth, D. Dahle, M. Huntley, V. Kiron, *Nannochloropsis oceanica*-derived defatted meal as an alternative to fishmeal in Atlantic salmon feeds, *PLoS One*. 12 (2017). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0179907>.
  - [19] I. Rawat, R. Ranjith Kumar, T. Mutanda, F. Bux, Dual role of microalgae: Phycoremediation of domestic wastewater and biomass production for sustainable biofuels production, *Appl. Energy*. 88 (2011) 3411–3424. <https://doi.org/10.1016/j.apenergy.2010.11.025>.
  - [20] C.V. González-López, F.G. Acién, J.M. Fernández-Sevilla, E. Molina, Uso de microalgas como alternativa a las tecnologías disponibles de mitigación de emisiones antropogénicas de CO<sub>2</sub>, *Rev. Latinoam. Biotecnol. Ambient. y Algal*. 2 (2011) 93–106.
  - [21] N. Vanhoudt, H. Vandenhove, N. Leys, P. Janssen, Potential of higher plants, algae, and cyanobacteria for remediation of radioactively contaminated waters, *Chemosphere*. 207 (2018) 239–254. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2018.05.034>.
  - [22] R. Carrasco-Reinado, A. Escobar-Niño, C. Fajardo, F.J. Fernández-Acero, P. Guarnizo-García, Proteína Recombinante de *Nannochloropsis Gaditana*, P201930775, 2019.
  - [23] L. Brennan, P. Owende, Biofuels from microalgae-A review of technologies for production,

- processing, and extractions of biofuels and co-products, *Renew. Sustain. Energy Rev.* 14 (2010) 557–577. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2009.10.009>.
- [24] S.H. Lee, H.J. Kang, H.J. Lee, M.H. Kang, Y.K. Park, Six-week supplementation with *Chlorella* has favorable impact on antioxidant status in Korean male smokers, *Nutrition*. 26 (2010) 175–183. <https://doi.org/10.1016/j.nut.2009.03.010>.
- [25] J. Sheng, F. Yu, Z. Xin, L. Zhao, X. Zhu, Q. Hu, Preparation, identification and their antitumor activities in vitro of polysaccharides from *Chlorella pyrenoidosa*, *Food Chem.* 105 (2007) 533–539. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2007.04.018>.
- [26] S. Miquel, M. Beaumont, R. Martín, P. Langella, V. Braesco, M. Thomas, A proposed framework for an appropriate evaluation scheme for microorganisms as novel foods with a health claim in Europe, *Microb. Cell Fact.* 14 (2015) 1–11. <https://doi.org/10.1186/s12934-015-0229-1>.
- [27] P. Spolaore, C. Joannis-Cassan, E. Duran, A. Isambert, Commercial applications of microalgae, *J. Biosci. Bioeng.* 101 (2006) 87–96. <https://doi.org/10.1263/jbb.101.87>.
- [28] H.J. Morris Quevedo, M.M. Quintana Cabrales, A. Almarales Arceo, L. Hernández Nazario, Composición bioquímica y evaluación de la calidad proteica de la biomasa autotrófica de *Chlorella vulgaris*, *Rev. Cuba. Aliment. Nutr.* (1999) 123–8. [http://bvs.sld.cu/revistas/ali/vol13\\_2\\_99/ali07299.htm](http://bvs.sld.cu/revistas/ali/vol13_2_99/ali07299.htm) (accessed July 14, 2020).
- [29] F.J. Corrales, Traduciendo el código de la vida. La proteómica, SEBBM Divulg. La Cienc. Al Alcance La Mano. (2019). [https://doi.org/10.18567/sebbmdiv\\_RPC.2019.08.1](https://doi.org/10.18567/sebbmdiv_RPC.2019.08.1).
- [30] M.T. Croft, M. Moulin, M.E. Webb, A.G. Smith, Thiamine biosynthesis in algae is regulated by riboswitches, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 104 (2007) 20770–20775. <https://doi.org/10.1073/pnas.0705786105>.
- [31] N. Shao, R. Bock, A codon-optimized luciferase from *Gaussia princeps* facilitates the in vivo monitoring of gene expression in the model alga *Chlamydomonas reinhardtii*, *Curr. Genet.* 53 (2008) 381–388. <https://doi.org/10.1007/s00294-008-0189-7>.
- [32] R. Surzycki, L. Cournac, G. Peltier, J.D. Rochaix, Potential for hydrogen production with inducible chloroplast gene expression in *Chlamydomonas*, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 104 (2007) 17548–17553. <https://doi.org/10.1073/pnas.0704205104>.
- [33] L. Lubián, *Nannochloropsis gaditana* sp. nov., una nueva Eustigmatophyceae marina, *Lazaroa*. 293 (1982) 287–294. <https://doi.org/10.5209/LAZAROA.12040>.
- [34] A. Richmond, Biological Principles of Mass Cultivation, in: *Handb. Microalgal Cult.*, Blackwell

- Publishing Ltd, Oxford, UK, 2007: pp. 125–177. <https://doi.org/10.1002/9780470995280.ch8>.
- [35] L. Martínez García, Eliminación de CO<sub>2</sub> con microalgas autóctonas, (2009). <https://dialnet.unirioja.es/servlet/tesis?codigo=26675&info=resumen&idioma=SPA> (accessed July 14, 2020).
- [36] M.A. Borowitzka, Commercial production of microalgae: ponds, tanks, tubes and fermenters, in: J. Biotechnol., Elsevier Sci B.V., 1999: pp. 313–321. [https://doi.org/10.1016/S0168-1656\(99\)00083-8](https://doi.org/10.1016/S0168-1656(99)00083-8).
- [37] M. Berenguel, F. Rodríguez, F.G. Acién, J.L. García, Model predictive control of pH in tubular photobioreactors, J. Process Control. 14 (2004) 377–387. <https://doi.org/10.1016/j.jprocont.2003.07.001>.
- [38] B. Sialve, N. Bernet, O. Bernard, Anaerobic digestion of microalgae as a necessary step to make microalgal biodiesel sustainable, 2009. <https://hal.inria.fr/hal-00854465> (accessed July 9, 2020).
- [39] N. Abatzoglou, S. Boivin, A review of biogas purification processes, Biofuels, Bioprod. Biorefining. 3 (2009) 42–71. <https://doi.org/10.1002/bbb.117>.
- [40] F.G. Acién, J.M. Fernández, J.J. Magán, E. Molina, Production cost of a real microalgae production plant and strategies to reduce it, Biotechnol. Adv. 30 (2012) 1344–1353. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2012.02.005>.
- [41] S.H. Ho, C.Y. Chen, D.J. Lee, J.S. Chang, Perspectives on microalgal CO<sub>2</sub>-emission mitigation systems - A review, Biotechnol. Adv. 29 (2011) 189–198. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2010.11.001>.
- [42] N. Abdel-Raouf, A.A. Al-Homaidan, I.B.M. Ibraheem, Microalgae and wastewater treatment, Saudi J. Biol. Sci. 19 (2012) 257–275. <https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2012.04.005>.
- [43] J.U. Grobbelaar, Algal Nutrition - Mineral Nutrition, in: Handb. Microalgal Cult., Blackwell Publishing Ltd, 2007: pp. 95–115. <https://doi.org/10.1002/9780470995280.ch6>.
- [44] S.H. Ho, C.Y. Chen, J.S. Chang, Effect of light intensity and nitrogen starvation on CO<sub>2</sub> fixation and lipid/carbohydrate production of an indigenous microalga *Scenedesmus obliquus* CNW-N, Bioresour. Technol. 113 (2012) 244–252. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2011.11.133>.
- [45] A. Kazbar, G. Cogne, B. Urbain, H. Marec, B. Le-Gouic, J. Tallec, H. Takache, A. Ismail, J. Pruvost, Effect of dissolved oxygen concentration on microalgal culture in photobioreactors, Algal Res. 39 (2019) 101432. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2019.101432>.
- [46] C. Posten, Design principles of photo-bioreactors for cultivation of microalgae, Eng. Life Sci. 9 (2009) 165–177. <https://doi.org/10.1002/elsc.200900003>.

- [47] J.B.K. Park, R.J. Craggs, A.N. Shilton, Recycling algae to improve species control and harvest efficiency from a high rate algal pond, *Water Res.* 45 (2011) 6637–6649. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2011.09.042>.
- [48] I. de Godos, S. Blanco, P.A. García-Encina, E. Becares, R. Muñoz, Long-term operation of high rate algal ponds for the bioremediation of piggery wastewaters at high loading rates, *Bioresour. Technol.* 100 (2009) 4332–4339. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2009.04.016>.
- [49] Y. Chisti, Biodiesel from microalgae, *Biotechnol. Adv.* 25 (2007) 294–306. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2007.02.001>.
- [50] R. Kothari, A. Pandey, S. Ahmad, A. Kumar, V. V. Pathak, V. V. Tyagi, Microalgal cultivation for value-added products: a critical enviro-economical assessment, 3 *Biotech.* 7 (2017). <https://doi.org/10.1007/s13205-017-0812-8>.
- [51] E.C. McGriff, R.E. McKinney, The removal of nutrients and organics by activated algae, *Water Res.* 6 (1972) 1155–1164. [https://doi.org/10.1016/0043-1354\(72\)90015-2](https://doi.org/10.1016/0043-1354(72)90015-2).
- [52] E. Molina Grima, E.H. Belarbi, F.G. Ación Fernández, A. Robles Medina, Y. Chisti, Recovery of microalgal biomass and metabolites: Process options and economics, *Biotechnol. Adv.* 20 (2003) 491–515. [https://doi.org/10.1016/S0734-9750\(02\)00050-2](https://doi.org/10.1016/S0734-9750(02)00050-2).
- [53] D.T. Tran, B.H. Le, D.J. Lee, C.L. Chen, H.Y. Wang, J.S. Chang, Microalgae harvesting and subsequent biodiesel conversion, *Bioresour. Technol.* 140 (2013) 179–186. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2013.04.084>.
- [54] S. Dinesh Kumar, S. Ananth, S. Jeyanthi, R. Sasirekha, C. Premkumar, Effect of culture conditions on growth and lipid content of marine microalga *Nannochloropsis* sp. strain (PSDK11), 2017.
- [55] Z.Y. Wen, F. Chen, Heterotrophic production of eicosapentaenoic acid by microalgae, *Biotechnol. Adv.* 21 (2003) 273–294. [https://doi.org/10.1016/S0734-9750\(03\)00051-X](https://doi.org/10.1016/S0734-9750(03)00051-X).
- [56] P. Han, Q. Lu, L. Fan, W. Zhou, A Review on the Use of Microalgae for Sustainable Aquaculture, *Appl. Sci.* 9 (2019) 2377. <https://doi.org/10.3390/app9112377>.
- [57] I. Sirakov, K. Velichkova, S. Stoyanova, Y. Staykov, C. Katya Velichkova, The importance of microalgae for aquaculture industry. Review, *Int. J. Fish. Aquat. Stud.* 2 (2015) 81–84. [www.fao.org/es/ESA/riga/english/index\\_en.htm](http://www.fao.org/es/ESA/riga/english/index_en.htm) (accessed July 18, 2020).
- [58] Q. Lu, J. Li, J. Wang, K. Li, J. Li, P. Han, P. Chen, W. Zhou, Exploration of a mechanism for the production of highly unsaturated fatty acids in *Scenedesmus* sp. at low temperature grown on oil crop residue based medium, *Bioresour. Technol.* 244 (2017) 542–551.



<https://doi.org/10.1016/j.biortech.2017.08.005>.

- [59] F.A. Ansari, P. Singh, A. Guldhe, F. Bux, Microalgal cultivation using aquaculture wastewater: Integrated biomass generation and nutrient remediation, *Algal Res.* 21 (2017) 169–177. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2016.11.015>.
- [60] A. Catarina, F. Xavier, Nutritional Value and Uses of Microalgae in Aquaculture, in: *Aquaculture*, InTech, 2012. <https://doi.org/10.5772/30576>.
- [61] A.M. Santos, Y. González-Arachevala, C. Martín-Sastre, Uso y aplicaciones potenciales de las microalgas, (2014). <https://www.iit.comillas.edu/docs/IIT-14-027A.pdf>.
- [62] FAO, Rural Income Gener. Act. Database. (2009). [www.fao.org/es/ESA/riga/english/index\\_en.htm](http://www.fao.org/es/ESA/riga/english/index_en.htm).
- [63] K. Velichkova, I. Sirakov, S. Stoyanova, Biomass production and wastewater treatment from aquaculture with *Chlorella vulgaris* under different carbon sources, 2014. [www.algaedepot.com](http://www.algaedepot.com) (accessed July 18, 2020).
- [64] C.T. Enright, G.F. Newkirk, J.S. Craigie, J.D. Castell, Evaluation of phytoplankton as diets for juvenile *Ostrea edulis* L., *J. Exp. Mar. Bio. Ecol.* 96 (1986) 1–13. [https://doi.org/10.1016/0022-0981\(86\)90009-2](https://doi.org/10.1016/0022-0981(86)90009-2).
- [65] M.R. Brown, S.W. Jeffrey, J.K. Volkman, G.A. Dunstan, Nutritional properties of microalgae for mariculture, in: *Aquaculture*, Elsevier, 1997: pp. 315–331. [https://doi.org/10.1016/S0044-8486\(96\)01501-3](https://doi.org/10.1016/S0044-8486(96)01501-3).
- [66] P.A. Thompson, M. Guo, P.J. Harrison, The influence of irradiance on the biochemical composition of three phytoplankton species and their nutritional value for larvae of the Pacific Oyster (*Crassostrea gigas*), *Mar. Biol.* 117 (1993) 259–268. <https://doi.org/10.1007/BF00345671>.
- [67] J. Fleurence, M. Moránçais, J. Dumay, P. Decottignies, V. Turpin, M. Munier, N. Garcia-Bueno, P. Jaouen, What are the prospects for using seaweed in human nutrition and for marine animals raised through aquaculture?, *Trends Food Sci. Technol.* 27 (2012) 57–61. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2012.03.004>.
- [68] I. Zaťková, M. Sergejevová, J. Urban, R. Vachta, D. Štys, J. Masojídek, Carotenoid-enriched microalgal biomass as feed supplement for freshwater ornamentals: Albinic form of wels catfish (*Silurus glanis*), *Aquac. Nutr.* 17 (2011) 278–286. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2095.2009.00751.x>.
- [69] M. Sergejevová, J. Masojídek, *Chlorella* biomass as feed supplement for freshwater fish: Sterlet,

- Acipenser ruthenus, Aquac. Res. 44 (2012) 157–159. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2109.2011.03011.x>.
- [70] L. Gouveia, P. Rema, Effect of microalgal biomass concentration and temperature on ornamental goldfish (*Carassius auratus*) skin pigmentation, Aquac. Nutr. 11 (2005) 19–23. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2095.2004.00319.x>.
- [71] I. Rønnestad, S. Helland, Lie, Feeding *Artemia* to larvae of Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus* L.) results in lower larval vitamin A content compared with feeding copepods, Aquaculture. 165 (1998) 159–164. [https://doi.org/10.1016/S0044-8486\(98\)00258-0](https://doi.org/10.1016/S0044-8486(98)00258-0).
- [72] *Nannochloropsis Gaditana* (premium)-microalgas-acuicultura - Buy Fitoplancton Product on Alibaba.com. <https://spanish.alibaba.com/product-detail/nannochloropsis-gaditana-premium-microalgae-aquaculture-158235584.html> (accessed July 19, 2020).
- [73] S.K. Prajapati, P. Kaushik, A. Malik, V.K. Vijay, Phycoremediation coupled production of algal biomass, harvesting and anaerobic digestion: Possibilities and challenges, Biotechnol. Adv. 31 (2013) 1408–1425. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2013.06.005>.
- [74] J.Q. Xiong, M.B. Kurade, B.H. Jeon, Can Microalgae Remove Pharmaceutical Contaminants from Water?, Trends Biotechnol. 36 (2018) 30–44. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2017.09.003>.
- [75] C. León, D. Chaves, Tratamiento de residual vacuno utilizando microalgas, la lenteja de agua *Lemna aequinoctiales* y un humedal subsuperficial en Costa Rica, Rev. Latinoam. Biotecnol. Ambient. Algal. 1 (2010) 155–177.
- [76] G. Markou, D. Georgakakis, Cultivation of filamentous cyanobacteria (blue-green algae) in agro-industrial wastes and wastewaters: A review, Appl. Energy. 88 (2011) 3389–3401. <https://doi.org/10.1016/j.apenergy.2010.12.042>.
- [77] N.F.Y. Tam, Y.S. Wong, Effect of ammonia concentrations on growth of *Chlorella vulgaris* and nitrogen removal from media, Bioresour. Technol. 57 (1996) 45–50. [https://doi.org/10.1016/0960-8524\(96\)00045-4](https://doi.org/10.1016/0960-8524(96)00045-4).
- [78] L. Wang, Y. Li, P. Chen, M. Min, Y. Chen, J. Zhu, R.R. Ruan, Anaerobic digested dairy manure as a nutrient supplement for cultivation of oil-rich green microalgae *Chlorella sp.*, Bioresour. Technol. 101 (2010) 2623–2628. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2009.10.062>.
- [79] Y. Li, Y.F. Chen, P. Chen, M. Min, W. Zhou, B. Martinez, J. Zhu, R. Ruan, Characterization of a microalga *Chlorella sp.* well adapted to highly concentrated municipal wastewater for nutrient removal and biodiesel production, Bioresour. Technol. 102 (2011) 5138–5144. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2011.01.091>.

- [80] S. Hongyang, Z. Yalei, Z. Chunmin, Z. Xuefei, L. Jinpeng, Cultivation of *Chlorella pyrenoidosa* in soybean processing wastewater, *Bioresour. Technol.* 102 (2011) 9884–9890. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2011.08.016>.
- [81] O. Hammouda, A. Gaber, N. Abdel-Raouf, Microalgae and wastewater treatment, *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 31 (1995) 205–210. <https://doi.org/10.1006/eesa.1995.1064>.
- [82] A. Ruiz-Marin, L.G. Mendoza-Espinosa, T. Stephenson, Growth and nutrient removal in free and immobilized green algae in batch and semi-continuous cultures treating real wastewater, *Bioresour. Technol.* 101 (2010) 58–64. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2009.02.076>.
- [83] N.K. Srivastava, C.B. Majumder, Novel biofiltration methods for the treatment of heavy metals from industrial wastewater, *J. Hazard. Mater.* 151 (2008) 1–8. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2007.09.101>.
- [84] D. Voltolina, B. Cordero, M. Nieves, L.P. Soto, Growth of *Scenedesmus* sp. in artificial wastewater, *Bioresour. Technol.* 68 (1999) 265–268. [https://doi.org/10.1016/S0960-8524\(98\)00150-3](https://doi.org/10.1016/S0960-8524(98)00150-3).
- [85] E.W. Wilde, J.R. Benemann, Bioremoval of heavy metals by the use of microalgae, *Biotechnol. Adv.* 11 (1993) 781–812. [https://doi.org/10.1016/0734-9750\(93\)90003-6](https://doi.org/10.1016/0734-9750(93)90003-6).
- [86] H.V. Perales-Vela, J.M. Peña-Castro, R.O. Cañizares-Villanueva, Heavy metal detoxification in eukaryotic microalgae, *Chemosphere.* 64 (2006) 1–10. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2005.11.024>.
- [87] J.M. Peña-Castro, F. Martínez-Jerónimo, F. Esparza-García, R.O. Cañizares-Villanueva, Heavy metals removal by the microalga *Scenedesmus incrassatulus* in continuous cultures, *Bioresour. Technol.* 94 (2004) 219–222. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2003.12.005>.
- [88] L. Travieso, A. Pellón, F. Benítez, E. Sánchez, R. Borja, N. O’Farrill, P. Weiland, BIOALGA reactor: Preliminary studies for heavy metals removal, *Biochem. Eng. J.* 12 (2002) 87–91. [https://doi.org/10.1016/S1369-703X\(02\)00045-1](https://doi.org/10.1016/S1369-703X(02)00045-1).
- [89] D. Saranya, S. Shanthakumar, An integrated approach for tannery effluent treatment with ozonation and phycoremediation: A feasibility study, *Environ. Res.* 183 (2020). <https://doi.org/10.1016/j.envres.2020.109163>.
- [90] A. Llopiz, Active compounds from cyanobacteria and microalgae: properties and potential applications in biomedicine, (2016). <https://doi.org/10.21931/RB/2016.01.02.8>.
- [91] M.R. Irhimeh, J.H. Fitton, R.M. Lowenthal, Pilot clinical study to evaluate the anticoagulant activity of fucoidan, *Blood Coagul. Fibrinolysis.* 20 (2009) 607–610.

<https://doi.org/10.1097/MBC.0b013e32833135fe>.

- [92] A.J. Aliste, F.F. Vieira, N.L. Del Mastro, Radiation effects on agar, alginates and carrageenan to be used as food additives, in: *Radiat. Phys. Chem.*, Elsevier Science Ltd, 2000: pp. 305–308. [https://doi.org/10.1016/S0969-806X\(99\)00471-5](https://doi.org/10.1016/S0969-806X(99)00471-5).
- [93] M.M. El-Sheekh, M.E.H. Osman, M.A. Dyab, M.S. Amer, Production and characterization of antimicrobial active substance from the cyanobacterium *Nostoc muscorum*, *Environ. Toxicol. Pharmacol.* 21 (2006) 42–50. <https://doi.org/10.1016/j.etap.2005.06.006>.
- [94] O. Perez-Garcia, F.M.E. Escalante, L.E. de-Bashan, Y. Bashan, Heterotrophic cultures of microalgae: Metabolism and potential products, *Water Res.* 45 (2011) 11–36. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2010.08.037>.
- [95] C.C. Gallardo, E.E. Cano, G.G. Lopez, V. Blas, R. Olvera, C.M. Franco, B.R. Ortiz, Las ficobiliproteínas de *Spirulina maxima* y *Pseudanabaena tenuis* protegen contra el daño hepático y el estrés oxidativo ocasionado por el Hg<sup>2+</sup>, *Rev. Mex. Ciencias Farm.* (2010).
- [96] V. Blas-Valdivia, R. Ortiz-Butrón, M. Pineda-Reynoso, A. Hernández-García, E. Cano-Europa, *Chlorella vulgaris* administration prevents HgCl<sub>2</sub>-caused oxidative stress and cellular damage in the kidney, *J. Appl. Phycol.* 23 (2011) 53–58. <https://doi.org/10.1007/s10811-010-9534-6>.
- [97] Estadísticas del cáncer - Instituto Nacional del Cáncer. <https://www.cancer.gov/espanol/cancer/naturaleza/estadisticas> (accessed July 26, 2020).
- [98] G. Riccio, C. Lauritano, Microalgae with immunomodulatory activities, *Mar. Drugs.* 18 (2020). <https://doi.org/10.3390/md18010002>.
- [99] I.C. Sheih, T.J. Fang, T.K. Wu, P.H. Lin, Anticancer and antioxidant activities of the peptide fraction from algae protein waste, *J. Agric. Food Chem.* 58 (2010) 1202–1207. <https://doi.org/10.1021/jf903089m>.
- [100] R. Chinery, J.A. Brockman, M.O. Peeler, Y. Shyr, R.D. Beauchamp, R.J. Coffey, Antioxidants enhance the cytotoxicity of chemotherapeutic agents in colorectal cancer: A p53-independent induction of p21(WAF1/CIP1) via C/EBP $\beta$ , *Nat. Med.* 3 (1997) 1233–1241. <https://doi.org/10.1038/nm1197-1233>.
- [101] Microalgal compounds modulate carcinogenesis in the gastrointestinal tract, *Trends Biotechnol.* 31 (2013) 92–98. <https://doi.org/10.1016/J.TIBTECH.2012.11.004>.
- [102] K.D. Moynihan, C.F. Opel, G.L. Szeto, A. Tzeng, E.F. Zhu, J.M. Engreitz, R.T. Williams, K. Rakhra, M.H. Zhang, A.M. Rothschilds, S. Kumari, R.L. Kelly, B.H. Kwan, W. Abraham, K. Hu, N.K. Mehta, M.J. Kauke, H. Suh, J.R. Cochran, D.A. Lauffenburger, K.D. Wittrup, D.J.

- Irvine, Eradication of large established tumors in mice by combination immunotherapy that engages innate and adaptive immune responses, *Nat. Med.* 22 (2016) 1402–1410. <https://doi.org/10.1038/nm.4200>.
- [103] L. Zanella, F. Vianello, Microalgae of the genus *Nannochloropsis*: Chemical composition and functional implications for human nutrition, *J. Funct. Foods.* 68 (2020). <https://doi.org/10.1016/j.jff.2020.103919>.
- [104] M. Gantar, Z. Svirčev, Microalgae and cyanobacteria: Food for thought, *J. Phycol.* 44 (2008) 260–268. <https://doi.org/10.1111/j.1529-8817.2008.00469.x>.
- [105] J. Dyerberg, H. Bang, Dietary fat and thrombosis, *Lancet* (Jan). 21 (1978) 152. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(78\)90448-8](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(78)90448-8).
- [106] Â.P. Matos, The Impact of Microalgae in Food Science and Technology, *JAOCs, J. Am. Oil Chem. Soc.* 94 (2017) 1333–1350. <https://doi.org/10.1007/s11746-017-3050-7>.
- [107] E. Günerken, E. D'Hondt, M.H.M. Eppink, L. Garcia-Gonzalez, K. Elst, R.H. Wijffels, Cell disruption for microalgae biorefineries, *Biotechnol. Adv.* 33 (2015) 243–260. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2015.01.008>.
- [108] M. Koller, A. Muhr, G. Braunege, Microalgae as versatile cellular factories for valued products, *Algal Res.* 6 (2014) 52–63. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2014.09.002>.
- [109] Algae Industry Magazine, Bunge, Solazyme Expand JV Heal. Foods. (2015). <http://www.algaeindustrymagazine.com> (accessed July 30, 2020).
- [110] J.R. Nelson, O. Wani, H.T. May, M. Budoff, Potential benefits of eicosapentaenoic acid on atherosclerotic plaques, *Vascul. Pharmacol.* 91 (2017) 1–9. <https://doi.org/10.1016/j.vph.2017.02.004>.
- [111] Microalgas | TEC. <https://www.tec.ac.cr/grupo-investigacion/microalgas> (accessed August 30, 2020).
- [112] Porcina Americana | Producción de cerdo | Grupo Zamora. <https://www.carneszamora.com/porcina-americana> (accessed August 30, 2020).
- [113] C. Enzing, M. Ploeg, M. Barbosa, L. Sijtsma, Microalgae-based products for the food and feed sector: an outlook for Europe, 2014. <https://doi.org/10.2791/3339>.
- [114] Producción de biocompuestos saludables de microalgas con aplicaciones alimentarias. <https://www.aponiente.com/wp-content/uploads/2019/04/proyecto-A4HW.pdf> (accessed August 30, 2020).

- [115] G. Panis, J.R. Carreon, Commercial astaxanthin production derived by green alga *Haematococcus pluvialis*: A microalgae process model and a techno-economic assessment all through production line, *Algal Res.* 18 (2016) 175–190. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2016.06.007>.
- [116] K.M. Rahman, Food and High Value Products from Microalgae: Market Opportunities and Challenges, in: *Microalgae Biotechnol. Food, Heal. High Value Prod.*, Springer Singapore, 2020: pp. 3–27. [https://doi.org/10.1007/978-981-15-0169-2\\_1](https://doi.org/10.1007/978-981-15-0169-2_1).
- [117] A. Demirbas, M.F. Demirbas, Algae Energy: Algae as a New Source of Biodiesel, *Green Energy Technol.* 36 (2010). <https://doi.org/10.1007/978-1-84996-050-2>.
- [118] M.S. Araújo, D.I. Bolnick, C.A. Layman, The ecological causes of individual specialisation, *Ecol. Lett.* 14 (2011) 948–958. <https://doi.org/10.1111/j.1461-0248.2011.01662.x>.
- [119] D.M. Wall, S. McDonagh, J.D. Murphy, Cascading biomethane energy systems for sustainable green gas production in a circular economy, *Bioresour. Technol.* 243 (2017) 1207–1215. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2017.07.115>.
- [120] ¿Qué es Horizonte 2020? / Horizonte2020. <https://eshorizonte2020.es/que-es-horizonte-2020> (accessed August 30, 2020).
- [121] A. Orfao, J. Benítez, F. Corrales, I. Martín-Subero, J.M. Ordovás, Á. Carracedo, P. Lapunzina, *Ciencias Ómicas*, 2019. [www.instituto-roche.es](http://www.instituto-roche.es) (accessed August 9, 2020).
- [122] R.P. Horgan, L.C. Kenny, ‘Omic’ technologies: genomics, transcriptomics, proteomics and metabolomics, *Obstet. Gynaecol.* 13 (2011) 189–195. <https://doi.org/10.1576/toag.13.3.189.27672>.
- [123] La historia de la PCR. <https://diagnostics.roche.com/es/es/article-listing/history-of-pcr.html> (accessed August 18, 2020).
- [124] W. Jiang, A.J. Brueggeman, K.M. Horken, T.M. Plucinak, D.P. Weeks, Successful transient expression of Cas9 and single guide RNA genes in *Chlamydomonas reinhardtii*, *Eukaryot. Cell.* 13 (2014) 1465–1469. <https://doi.org/10.1128/EC.00213-14>.
- [125] L. Yao, I. Cengic, J. Anfelt, E.P. Hudson, Multiple Gene Repression in Cyanobacteria Using CRISPRi, *ACS Synth. Biol.* 5 (2016) 207–212. <https://doi.org/10.1021/acssynbio.5b00264>.
- [126] C.H. Huang, C.R. Shen, H. Li, L.Y. Sung, M.Y. Wu, Y.C. Hu, CRISPR interference (CRISPRi) for gene regulation and succinate production in cyanobacterium *S. elongatus* PCC 7942, *Microb. Cell Fact.* 15 (2016) 196. <https://doi.org/10.1186/s12934-016-0595-3>.
- [127] El sistema CRISPR/Cas9. <https://www.reproduccionasistida.org/autorizacion-de-modificacion->

- de-embriones/sistema-crispr-cas9/ (accessed August 17, 2020).
- [128] A. Cieslak, I. Ribera, Aplicaciones de proteómica en ecología y evolución, Ecosistemas. 18 (2009) 34–43.
- [129] Thermo Fisher Scientific - ES. <https://www.thermofisher.com/es/es/home.html> (accessed September 18, 2020).
- [130] T. Moses, P. Mehrshahi, A.G. Smith, A. Goossens, Synthetic biology approaches for the production of plant metabolites in unicellular organisms, J. Exp. Bot. 68 (2017) 4057–4074. <https://doi.org/10.1093/jxb/erx119>.
- [131] C.M. Montone, A.L. Capriotti, C. Cavaliere, G. La Barbera, S. Piovesana, R. Zenezini Chiozzi, A. Laganà, Peptidomic strategy for purification and identification of potential ACE-inhibitory and antioxidant peptides in *Tetrademus obliquus* microalgae, Anal. Bioanal. Chem. 410 (2018) 3573–3586. <https://doi.org/10.1007/s00216-018-0925-x>.
- [132] R. Maghembe, D. Damian, A. Makaranga, S.S. Nyandoro, S.L. Lyantagaye, S. Kusari, R. Hatti-Kaul, Omics for Bioprospecting and Drug Discovery from Bacteria and Microalgae, Antibiotics. 9 (2020) 229. <https://doi.org/10.3390/antibiotics9050229>.
- [133] UTEX Culture Collection of Algae. <https://utex.org/> (accessed July 8, 2020).

## 10. Apéndices

**Tabla 1:** Factores que afectan al cultivo y crecimiento de microalgas [12]. Tomada de Okoro, V., Azimov, U., Munoz, J., Hernandez, H. H., & Phan, A. N. (2019). Microalgae cultivation and harvesting: Growth performance and use of flocculants-A review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 115, 109364.

| Abiotic   | Biotic  | Process related   |
|---|---|---|
| <ul style="list-style-type: none"> <li>● Temperature</li> <li>● pH</li> <li>● Light</li> <li>● Concentration of nutrients</li> <li>● Carbon dioxide content</li> <li>● Cultivation medium</li> <li>● Salinity</li> <li>● Presence of toxic chemical in culture</li> </ul> | <ul style="list-style-type: none"> <li>● Bacteria</li> <li>● Fungi</li> <li>● Viruses</li> <li>● Microalgae and strain</li> <li>● Microalgae cell history</li> <li>● Presence of other strain in the culture</li> </ul> | <ul style="list-style-type: none"> <li>● Biomass concentration</li> <li>● Intensity of mixing</li> <li>● Frequency of algae harvesting</li> </ul> |

**Tabla 2:** Composición del medio f/2 [133]. Tomado de UTEX Culture Collection of Algae. Recuperado el 8 de Julio de 2020 de <https://utex.org/>

### F/2 Medium

#### Directions

For 1 L Total

1. To approximately 950 mL of non-pasteurized seawater ( 30-35ppt), add each of the components in the order specified (except vitamins) while stirring continuously.

2. Bring total volume to 1 L with non-pasturized seawater.

\*For 1.5% agar medium add 15 g of agar into the flask; do not mix.

3. Cover and autoclave medium.

4. When cooled add sterile vitamins.

\*For agar medium add vitamins, mix, and dispense before agar solidifies.

5. Store at refrigerator temperature.

| # | Component  | Amount | Stock Solution Concentration   | Final Concentration |
|---|--|--------|--------------------------------|---------------------|
| 1 | NaNO <sub>3</sub> (Fisher BP360-500)                               | 1 mL   | 7.5 g/100 mL dH <sub>2</sub> O | 880 µM              |
| 2 | NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ·H <sub>2</sub> O(MCIB 742)       | 1 mL   | 0.5 g/100 mL dH <sub>2</sub> O | 36 µM               |
| 3 | Na <sub>2</sub> SiO <sub>3</sub> ·9H <sub>2</sub> O (Sigma 307815) | 1 mL   | 3 g/100 mL dH <sub>2</sub> O   | 106 µM              |
| 4 | Trace Metals Solution  | 1 mL/L |                                |                     |
| 5 | Vitamin B <sub>12</sub>  | 1 mL/L |                                |                     |
| 6 | Biotin Vitamin Solution  | 1 mL/L |                                |                     |
| 7 | Thiamine Vitamin Solution  | 1 mL/L |                                |                     |



*Tabla 2:* Continuación [133].**Trace Metals Solution****Directions**

For 1 L Total

1. Begin stirring and heating approximately 950 mL of dH<sub>2</sub>O.
2. When the stirring water approaches the boiling point, add the following components in the order listed.
3. Bring the volume to 1 L with dH<sub>2</sub>O.
4. Store at refrigerator temperature.

| # | Component   | Amount   | Stock Solution Concentration | Final Concentration |
|---|---|----------|------------------------------|---------------------|
| 1 | ZnSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O (Sigma Z 0251)   | 23 mg/L  |                              | 0.08 µM             |
| 2 | MnSO <sub>4</sub> ·H <sub>2</sub> O (Sigma M8179)   | 152 mg/L |                              | 0.9 µM              |
| 3 | Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> ·2H <sub>2</sub> O (J.T. Baker 3764)                               | 7.3 mg/L |                              | 0.03 µM             |
| 4 | CoSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O (Baker 1696)   | 14 mg/L  |                              | 0.05 µM             |
| 5 | CuCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O (Fisher C-455)   | 6.8 mg/L |                              | 0.04 µM             |
| 6 | Fe(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> (SO <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O (Sigma F-1513) | 4.6 g/L  |                              | 11.7 µM             |
| 7 | Na <sub>2</sub> EDTA·2H <sub>2</sub> O (Sigma ED255)  | 4.4 g/L  |                              | 11.7 µM             |

**Tabla 3:** Influencia de los parámetros físicos en la producción lipídica de *N. gaditana*. Tomado de S. Markose, A. Chellappan, P. Thangamani, S. George, S. Thangaswamy, C. Thavasimuthu, M. Mariavincent, Optimization of physical parameters for the growth and lipid production in *Nannochloropsis gaditana* (Lubian, 1982), J. Appl. Biol. Biotechnol. 8 (2020) 6–12. <https://doi.org/10.7324/JABB.2020.80302> [13].

| Factors          | Log phase   |             |             | Stationary phase |             |             |
|------------------|-------------|-------------|-------------|------------------|-------------|-------------|
|                  | Dry wt. g/l | Lipid g/l   | Lipid %     | Dry wt. g/l      | Lipid g/l   | Lipid %     |
| Salinity (ppt)   |             |             |             |                  |             |             |
| 20               | 0.94 ± 0.05 | 0.25 ± 0.53 | 27.0 ± 1.87 | 1.12 ± 0.08      | 0.20 ± 0.08 | 18.4 ± 2.40 |
| 25               | 1.06 ± 0.13 | 0.30 ± 0.58 | 28.7 ± 0.98 | 1.25 ± 0.78      | 0.17 ± 0.08 | 13.5 ± 2.89 |
| 30               | 1.15 ± 0.33 | 0.41 ± 0.28 | 35.8 ± 2.35 | 1.38 ± 0.16      | 0.32 ± 0.02 | 23.6 ± 1.62 |
| 35               | 0.75 ± 0.06 | 0.14 ± 0.37 | 19.1 ± 2.45 | 1.02 ± 0.25      | 0.07 ± 0.03 | 7.6 ± 0.90  |
| 40               | 0.37 ± 0.72 | 0.04 ± 0.38 | 11.6 ± 2.65 | 0.49 ± 0.12      | 0.03 ± 0.03 | 6.8 ± 1.06  |
| pH               |             |             |             |                  |             |             |
| 4                | 0.59 ± 0.06 | 0.08 ± 0.01 | 14.0 ± 1.00 | 0.79 ± 0.08      | 0.07 ± 0.01 | 9.2 ± 0.45  |
| 5                | 0.84 ± 0.36 | 0.16 ± 0.04 | 19.4 ± 2.20 | 1.15 ± 0.03      | 0.17 ± 0.09 | 15.5 ± 1.67 |
| 6                | 1.05 ± 0.08 | 0.25 ± 0.07 | 24.0 ± 2.62 | 1.22 ± 0.25      | 0.26 ± 0.07 | 21.6 ± 2.09 |
| 7                | 1.10 ± 0.05 | 0.32 ± 0.09 | 29.4 ± 1.87 | 1.11 ± 0.75      | 0.29 ± 0.09 | 26.4 ± 1.04 |
| 8                | 1.02 ± 0.35 | 0.35 ± 0.13 | 34.6 ± 1.39 | 1.10 ± 0.04      | 0.32 ± 0.00 | 29.7 ± 2.23 |
| 9                | 0.34 ± 0.06 | 0.05 ± 0.01 | 15.7 ± 1.76 | 0.89 ± 0.43      | 0.06 ± 0.00 | 7.0 ± 0.47  |
| 10               | 0.47 ± 0.00 | 0.03 ± 0.04 | 11.1 ± 0.87 | 0.73 ± 0.03      | 0.04 ± 0.00 | 5.7 ± 0.60  |
| Light (lux)      |             |             |             |                  |             |             |
| 1,000            | 0.43 ± 0.38 | 0.04 ± 0.01 | 9.9 ± 0.18  | 0.69 ± 0.18      | 0.03 ± 0.00 | 5.1 ± 0.25  |
| 2,000            | 1.13 ± 0.08 | 0.38 ± 0.05 | 33.8 ± 1.34 | 1.28 ± 0.21      | 0.23 ± 0.09 | 18.0 ± 1.04 |
| 3,000            | 1.09 ± 0.05 | 0.30 ± 0.09 | 27.8 ± 2.56 | 1.25 ± 0.08      | 0.17 ± 0.83 | 14.1 ± 1.67 |
| 4,000            | 0.65 ± 0.12 | 0.07 ± 0.03 | 10.8 ± 1.98 | 0.83 ± 0.02      | 0.05 ± 0.00 | 7.1 ± 1.94  |
| 5,000            | 0.76 ± 0.38 | 0.06 ± 0.00 | 8.8 ± 0.23  | 0.97 ± 0.28      | 0.04 ± 0.01 | 5.0 ± 1.96  |
| Temperature (°C) |             |             |             |                  |             |             |
| 20               | 0.78 ± 0.08 | 0.07 ± 0.05 | 12.4 ± 1.06 | 1.10 ± 0.33      | 0.18 ± 0.05 | 16.4 ± 1.50 |
| 25               | 0.95 ± 0.03 | 0.28 ± 0.09 | 29.4 ± 1.97 | 1.30 ± 0.21      | 0.31 ± 0.06 | 23.5 ± 2.03 |
| 30               | 1.28 ± 0.25 | 0.42 ± 0.30 | 32.9 ± 2.65 | 1.30 ± 0.80      | 0.39 ± 0.03 | 28.6 ± 1.26 |
| 35               | 1.10 ± 0.48 | 0.30 ± 0.08 | 27.1 ± 1.24 | 0.98 ± 0.28      | 0.07 ± 0.00 | 7.6 ± 1.51  |
| 40               | 0.68 ± 0.06 | 0.06 ± 0.00 | 9.6 ± 2.60  | 0.69 ± 0.03      | 0.04 ± 0.09 | 6.3 ± 1.03  |

**Tabla 4:** Niveles de remoción de contaminantes presentes en aguas residuales mediante cultivo de microalgas según diferentes autores. (HRAP = High Rate Algal Ponds, PBR = Photobioreactor, P = Planta Piloto). Tomado de A. Hernández-Pérez, J.I. Labbé, Microalgas, cultivo y beneficios, Rev. Biol. Mar. Oceanogr. 49 (2014) 157–173. <https://doi.org/10.4067/S0718-19572014000200001> [9].

| Parámetro       | Remoción (%)       | Especie   | Sistema de cultivo | Tipo de agua residual       | Escala | Fuente                          |
|-----------------|--------------------|---|--------------------|-----------------------------|--------|---------------------------------|
| NH <sub>4</sub> | 98,50              | Cultivo mixto, <i>Chlamydomonas</i> , <i>Chlorella</i> y <i>Nitzschia</i> (predominantes) | HRAP               | Agua residual de porqueriza | P      | de Godos <i>et al.</i> 2009     |
|                 | 60,1-80 / 96,6-100 | <i>Chlorella vulgaris</i> y <i>Scenedesmus obliquus</i> , respectivamente                 | PBR                | Agua residual municipal     | L      | Ruiz-Marín <i>et al.</i> 2010   |
|                 | 91-96              | Cultivo mixto, <i>Spirulina</i>   | HRAP               | Agua residual de porqueriza | L      | Olguín 2003                     |
|                 | Hasta 100          | Cultivo mixto, <i>Chlorella</i> y <i>Scenedesmus</i>                                      | PBR                | Agua residual municipal     | L      | Hammouda <i>et al.</i> 1995     |
|                 | Hasta 100          | <i>Chlorella vulgaris</i>   | *                  | Agua residual municipal     | L      | de-Bashan & Bashan 2003         |
|                 | Hasta 100          | <i>Scenedesmus obliquus</i>   | *                  | Aguas residual municipal    | L      | Lavoie & de la Noüe 1985        |
|                 | 85-90              | Cultivo mixto, <i>Microcystium</i>  | HRAP               | Aguas residual municipal    | P      | Nurdegan & Oswald 1995          |
| NO <sub>2</sub> | 69                 | Cultivo mixto   | HRAP               | Agua residual municipal     | P      | Hamouri <i>et al.</i> 1994      |
|                 | 96,23-100          | <i>Chlorella vulgaris</i> , <i>Synechocystis salina</i> y <i>Gloeoecapsa gelatinosa</i>   | *                  | Agua residual industrial    | L      | Dominic <i>et al.</i> 2009      |
| NO <sub>3</sub> | 90                 | <i>Phormidium uncinatum</i>   | PBR                | Agua residual artificial    | L      | Gil & Serra 1993 en Olguín 2003 |
|                 | 100                | Cultivo mixto, <i>Chlorella</i> y <i>Scenedesmus</i>                                      | PBR                | Agua residual municipal     | L      | Hammouda <i>et al.</i> 1995     |
|                 | 80,9-84            | <i>Chlorella vulgaris</i> , <i>Synechocystis salina</i> y <i>Gloeoecapsa gelatinosa</i>   | *                  | Agua residual industrial    | L      | Dominic <i>et al.</i> 2009      |
| PO <sub>4</sub> | 64,52-75           | <i>Chlorella vulgaris</i> , <i>Synechocystis salina</i> y <i>Gloeoecapsa gelatinosa</i>   | *                  | Agua residual industrial    | L      | Dominic <i>et al.</i> 2009      |
|                 | 92                 | <i>Chlorella vulgaris</i>   | *                  | Agua residual municipal     | L      | de-Bashan & Bashan 2003         |
|                 | 72-87              | <i>Spirulina</i>  | HRAP               | Agua residual de porqueriza | P      | Olguín 2003                     |
|                 | 52                 | Cultivo mixto   | HRAP               | Agua residual municipal     | P      | Hamouri <i>et al.</i> 1994      |
|                 | 95-99              | Cultivo mixto, <i>Microcystium</i>  | HRAP               | Aguas residual municipal    | P      | Nurdegan & Oswald 1995          |
| DBO             | 99                 | Cultivo mixto   | PBR                | Aguas residuales lácteas    | L      | Woertz <i>et al.</i> 2009       |
|                 | 84                 | Cultivo mixto, <i>Chlorella</i> y <i>Scenedesmus</i>                                      | PBR                | Agua residual municipal     | L      | Hammouda <i>et al.</i> 1995     |

Tabla 4: Continuación [9].

|     |           |   |      |                          |   |   |
|-----|-----------|---|------|--------------------------|---|---|
|     | 88        | Cultivo mixto   | HRAP | Agua residual municipal  | P | Hamouri <i>et al.</i> 1994                                      |
|     | 87        | Cultivo mixto, <i>Chlorella</i> y <i>Nitzschia</i>                      | PBR  | Agua residual municipal  | L | Mc Griff & Mc Kinney 1972                                       |
|     | 95-98     | Cultivo mixto, <i>Microactinium</i>                                     | HRAP | Agua residual municipal  | P | Nurlogan & Oswald 1995  |
| DQO | 81-91,7   | Cultivo mixto, <i>Chlorella</i> y <i>Scenedesmus</i> , respectivamente. | PBR  | Agua residual municipal  | L | Hammouda <i>et al.</i> 1995                                     |
|     | 92        | Cultivo mixto, <i>Chlorella</i> y <i>Nitzschia</i>                      | PBR  | Agua residual municipal  | L | Mc Griff & Mc Kinney 1972                                       |
|     | 80-85     | Cultivo mixto, <i>Microactinium</i>                                     | HRAP | Agua residual municipal  | P | Nurlogan & Oswald 1995  |
|     | 96,5-98   | Cultivo mixto, <i>Chlorella</i> y <i>Scenedesmus</i>                    | PBR  | Agua residual municipal  | L | Hammouda <i>et al.</i> 1995                                     |
| Fe  | 77,4-85   | Cultivo mixto, <i>Chlorella</i> y <i>Scenedesmus</i>                    | PBR  | Agua residual municipal  | L | Hammouda <i>et al.</i> 1995                                     |
| Mn  | 100       | Cultivo mixto, <i>Chlorella</i> y <i>Scenedesmus</i>                    | PBR  | Agua residual municipal  | L | Hammouda <i>et al.</i> 1995                                     |
| Ni  | 77,3-81   | Cultivo mixto, <i>Chlorella</i> y <i>Scenedesmus</i>                    | PBR  | Agua residual municipal  | L | Hammouda <i>et al.</i> 1995                                     |
| Cr  | 77,5-95   | Cultivo mixto, <i>Chlorella</i> y <i>Scenedesmus</i>                    | PBR  | Agua residual municipal  | L | Hammouda <i>et al.</i> 1995                                     |
|     | 39,6-78,2 | <i>Scenedesmus incrassatulus</i>  | *    | Agua residual artificial | L | Peña-Castro <i>et al.</i> 2004                                  |
|     | 48 y 31   | <i>Chlorella</i> y <i>Scenedesmus</i> , respectivamente                 | -    | -                        | L | Travieso <i>et al.</i> 1999 en Perales-Vela <i>et al.</i> 2006  |
| Cd  | 52,3-64   | Cultivo mixto, <i>Chlorella</i> y <i>Scenedesmus</i>                    | PBR  | Agua residual municipal  | L | Hammouda <i>et al.</i> 1995                                     |
|     | 24,1-65,7 | <i>Scenedesmus incrassatulus</i>  | *    | Agua residual artificial | L | Peña-Castro <i>et al.</i> 2004                                  |
|     | 65        | <i>Chlorella</i>  | -    | -                        | - | Matsunaga <i>et al.</i> 1999 en Perales-Vela <i>et al.</i> 2006 |
| Cu  | 25,6-43,9 | <i>Scenedesmus incrassatulus</i>  | *    | Agua residual artificial | L | Peña-Castro <i>et al.</i> 2004                                  |
| Co  | 82-93     | <i>Scenedesmus obliquus</i>   | PBR  | Agua residual artificial | L | Travieso <i>et al.</i> 2002                                     |

**Tabla 5:** Microalgas marinas con actividad inmunomoduladora. IL (interleuquina), PBMC (Human Peripheral Blood Mononuclear Cells), NA (not available), w/v (weight/volume). Tomado de G. Riccio, C. Lauritano, Microalgae with immunomodulatory activities, Mar. Drugs. 18 (2020). <https://doi.org/10.3390/md18010002> [98].

| Microalgae                       | Extract/Fraction/Compound   | Active Concentration       | Mechanism/Organism and Target Cells (or Model)  |
|----------------------------------|---|----------------------------|---|
| <i>Alexandrium tamarense</i>     | Total Extract/Fractions   | NA                         | Activation of IL-6/Human PBMC   |
| <i>Chaetoceros calcitrans</i>    | Fractions   | NA                         | Activation of IL-6/Human PBMC   |
| <i>Chaetoceros socialis</i>      | Total extract   | NA                         | Activation of IL-6/Human PBMC   |
| <i>Chlorella stigmatophora</i>   | Crude polysaccharide extracts   | 5 or 10 mg/kg              | Activation of phagocytic activity - SRBC/Mouse  |
| <i>Chlorella vulgaris</i>        | Diet supplementation/ commercially available pills  | 5 g/day                    | Improve of NK activity and serum level of INF- $\gamma$ , IL-1 $\beta$ and IL-12/Human trials   |
| <i>Dunaliella salina</i>         | Diet supplementation of commercially available spray-dried preparations                                   | 369, and 922.5 mg/kg       | MiceNK and Macrophage activation/In vivo mice model   |
| <i>Dunaliella salina</i>         | Fractions   | NA                         | Activation of IL-6/Human PBMC   |
| <i>Engelma gracilis</i>          | $\beta$ -Glucans  | 150 $\mu$ g/mL             | Activation of NK cells and improve in inflammatory mediator/Human PBMC  |
| <i>Gyrodinium impudicum</i>      | Sulfated exopolysaccharides   | 0.1-10 $\mu$ g/mL          | Macrophage activation/Murine  |
| <i>Skeletonema costatum</i>      | Total Extract/Fractions   | NA                         | Activation of IL-6/Human PBMC   |
| <i>Skeletonema dohrnii</i>       | Total Extract/Fractions   | NA                         | Activation of IL-6/Human PBMC   |
| <i>Skeletonema marinoi</i>       | Total Extract   | NA                         | Activation of IL-6/Human PBMC   |
| <i>Spirulina</i> sp.             | Food supplement of condensed water-soluble extract of commercially available spray dried <i>Spirulina</i> | NA                         | Augmentation of interferon production and NK cytotoxicity /Human trials   |
| <i>Tetraselmis chuii</i>         | Orally administration of lyophilized microalgae   | 50 or 100 g/Kg             | Increase in hemolytic complement activity, phagocytic capacity and expression levels of $\beta$ -defensin, major histocompatibility complex II $\alpha$ and colony-stimulating factor receptor-1/Gilthead sea bream |
| <i>Thalassiosira weissflogii</i> | Fractions   |                            | Activation of IL-6/Human PBMC   |
| <i>Thraustochytriidae</i> sp.    | Exopolysaccharides  | $10^{-3}$ to $10^{-9}$ w/v | B-cells proliferation/Human   |
| <i>Tribonema</i> sp.             | Sulfated polysaccharides  | 12.5-200 $\mu$ g/mL        | Macrophage proliferation and improved expression of cytokines/Mouse   |